

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C. 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing:

30 September 1999 (30.09.99)

International application No.:

PCT/JP99/01448

Applicant's or agent's file reference:

CGS 98-06 PCT

International filing date:

23 March 1999 (23.03.99)

Priority date:

24 March 1998 (24.03.98)

Applicant:

KISHIMOTO, Tadimitsu et al.

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

23 March 1999 (23.03.99)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was



was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J. Zahra

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

HASEGAWA, Yoshiki
Soei International Patent Firm
Kyobashi National Building, 6F.
13-10, Kyobashi 2-chome
Chuo-ku
Tokyo 104-0031
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 19 May 1999 (19.05.99)	
Applicant's or agent's file reference CGS 98-06 PCT	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP99/01448	International filing date (day/month/year) 23 March 1999 (23.03.99)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 24 March 1998 (24.03.98)
Applicant CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA et al	MAY 29 1999 S O E I

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
24 Marc 1998 (24.03.98)	10/95448	JP	17 May 1999 (17.05.99)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer Carlos Naranjo Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

HASEGAWA, Yoshiki
Soei Patent and Law Firm
6F, Kyobashi National Building
13-10, Kyobashi 2-chome
Chuo-ku
Tokyo 104-0031
JAPON

30 12 99

Date of mailing (day/month/year) - 30 September 1999 (30.09.99)		
Applicant's or agent's file reference CGS 98-06 PCT		IMPORTANT NOTICE
International application No. PCT/JP99/01448	International filing date (day/month/year) 23 March 1999 (23.03.99)	Priority date (day/month/year) 24 March 1998 (24.03.98)
Applicant CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:

AU,CN,EP,IL,JP,KR,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

AL,AM,AP,AT,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CU,CZ,DE,DK,EA,EE,ES,FI,GB,GE,GH,GM,HR,HU,ID,
IN,IS,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MD,MG,MK,MN,MW,MX,NO,NZ,OA,PL,PT,RO,RU,SD,SE,
SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,UA,UG,UZ,VN,YU,ZW

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 30 September 1999 (30.09.99) under No. WO 99/48528

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a **demand for international preliminary examination** must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the **national phase**, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

12T
Translation

5060

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference CGS 98-06 PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/01448	International filing date (day/month/year) 23 March 1999 (23.03.99)	Priority date (day/month/year) 24 March 1998 (24.03.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 45/00, 39/395, 48/00, 31/70, 31/56, 38/43		
Applicant CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 8 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☒ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 23 March 1999 (23.03.99)	Date of completion of this report 02 September 1999 (02.09.1999)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/01448

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/01448

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 24-27

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 24-27
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

See supplemental sheet for continuation of Box III. 1

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported
by the description that no meaningful opinion could be formed.

☒ no international search report has been established for said claims Nos. 24-27

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.

☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP 99/01448

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III. 1.

Claims 24-27 pertain to methods for treatment of the human body by therapy, and thus relate to subject matter which does not require international search by this International Searching Authority, under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/01448

IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- ☐ restricted the claims.
- ☐ paid additional fees.
- ☐ paid additional fees under protest.
- ☐ neither restricted nor paid additional fees.

2. ☒ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- ☐ complied with.
- ☒ not complied with for the following reasons:

See supplemental sheet for continuation of Box IV. 3

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- ☐ all parts.
- ☒ the parts relating to claims Nos. 1-23

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP 99/01448

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV. 3.

Although the invention described in Claim 4 and Claim 27 and in claims which refer back to these has the same active ingredient as in the invention described in Claim 1, there is no recognizable association between the mechanisms of pharmacological activity in the two cases, and hence the two cannot be said to be linked by a common special technical feature.

Therefore, this application is considered to include two inventions.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP 99/01448

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-3, 5, 6, 8-19, 21-23	YES
	Claims	4, 7, 20	NO
Inventive step (IS)	Claims	1-3, 5, 6, 8-19, 21-23	YES
	Claims	4, 7, 20	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-23	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1 : Japanese Pharmacopoeia Explanatory Manual
Editorial Committee "Japanese Pharmacopoeia
Explanatory Manual, 13th Revised Edition"
(July 10, 1996), C-1707-1712 (Section on
dexamethasone) [In Japanese]; especially
C-1712 "Applications"

The specification of the present application, page
11, lines 15-18, states that dexamethasone provokes the
induction of CXCR4 down-regulation.

Document 1 indicates that dexamethasone can be used
as a broad spectrum external preparation for inflammations
and allergies and other conditions.

Therefore, it is recognized that a substance which
causes the apparent disappearance of CXCR4 on cells has a
tissue repairing action. Thus, the invention as described
in Claims 4, 7 and 20 is not novel, because it is
described in Document 1.

None of the documents cited in the international
search report discloses the invention as described in
Claims 1-3, 5, 6, 8-19 and 21-23, and it is not obvious to
a person skilled in the art.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/JP 99/01448

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

Claim 4 describes a "tissue repair agent which contains an active ingredient which inhibits effects based on CXCR4"; however, this contradicts the account in the specification (especially page 22 lines 20-24), the abstract and other experimental examples, and is therefore unclear.

The international search report is based on the description in the Claims.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/01448

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 24-27

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 24 to 27 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

In inventions as set forth in claim 4, claim 27 and claims with the citation thereof, use is made of the same active ingredient as the one employed in invention as set forth in claim 1. However, it does not appear that there is any relationship between the mechanisms of the pharmacological activities thereof. Such being the case, it cannot be concluded that these two groups of inventions have a technical feature in common.

Thus, it is recognized that this International application involves two inventions.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/01448

Although claim 4 discloses "a tissue repairing agent containing the active ingredient inhibiting the effect based on CXCR4", this description is unclear and contradictory to the description in the specification (p. 22, lines 20-24), the description in the abstract and the description in the specification mainly relating to other test examples.

This International search report has been prepared based on the disclosures in claims.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP99/01448

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ A61K45/00, A61K39/395, A61K48/00, A61K31/70, A61K31/56,
A61K38/43

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ A61K45/00, A61K31/56

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CORINNA Fel and Hellmut C. Augustin "Endothelial Cells Differentially Express Functional CXC-Chemokine Receptor=4 (CXCR-4/Fusin) under the Control of Autocrine Activity and Exogeneous Cytokines" Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 247, No. 1 (Received by the JPO in June, 1998 P.38-45	1-23
PX	Kazunobu TACHIBANA et al., "The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract" Nature, Vol. 393 (1998 June) P.591-594	1-23
X	Nippon Yakkyokuhou Kaisetsusho Henshuu Inkai, "Dai 13 kaisei Nihon Yakkyokuhou Kaisetsusho", (issued July 10, 1996) C-1707-1712, Dekisametazon no kou, tokuni C-1712 "Tekiyoku" no koumoku	4, 7, 20

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 1 June, 1999 (01. 06. 99)	Date of mailing of the international search report 15 June, 1999 (15. 06. 99)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/01448

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Michael V. VOLIN et al., "Chemokine Receptor CXCR4 Expression in Endothelium" Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 242 Received by JICST on 19th January, 1998 P.46-53	1-23
A	Shalley K, GUPTA et al., "Chemokine Receptors in Human Endothelial Cells" The Journal of Biological Chemistry, Vol. 273, No. 7 Received by JICST on 3rd March, 1998 P.4282-4287	1-23



PCT

国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)
[PCT 18 条、PCT 規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 CGS 98-06 PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/01448	国際出願日 (日.月.年) 23.03.99	優先日 (日.月.年) 24.03.98
出願人(氏名又は名称) 中外製薬株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT 18 条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 5 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第 I 欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第 II 欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT 規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 1 図とする。 ☒ 出願人が示したとおりである。

☐ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第 1 ページの 2 の続き)

法第 8 条第 3 項 (PCT 17 条 (2) (a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 24-27 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲 24~27 は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT 第 17 条 (2) (a) (i) 及び PCT 規則 39.1 (i V) の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。

2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

第 II 欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第 1 ページの 3 の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲 4、請求の範囲 27 及びそれらの項を引用する請求の範囲に記載の発明は、請求の範囲 1 に記載の発明と、同じ有効成分を用いるものであるものの、両者の薬理活性は機作においてまったく関連性があるものと認められないから、両者に共通の特別な技術的特徴があるものとはいえない。

したがって、この国際出願には二の発明があるものと認める。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ A61K45/00, A61K39/395, A61K48/00, A61K31/70,
A61K31/56, A61K38/43

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ A61K45/00, A61K31/56

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN)、REGISTRY (STN)、MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	CORINNA Fel and Hellmut C. Augustin "Endothelial Cells Differentially Express Functional CXC-Chemokine Receptor=4 (CXCR-4/Fusin) under the Control of Autocrine Activity and Exogenous Cytokines" Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 247, No. 1 (1998年6月受け入れ) P. 38-45	1-23
PX	Kazunobu TACHIBANA et al. "The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract" Nature, Vol. 393 (1998年6月) P. 591-594	1-23

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01.06.99

国際調査報告の発送日

15.06.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 聖子

印

4C 9051

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	日本薬局方解説書編集委員会「第十三改正 日本薬局方解説書」 (平成8年7月10日発行) C-1707-1712 デキサメタゾンの項 特にC-1712の「適用」の項目	4, 7, 20
A	Michael V. VOLIN et al. "Chemokine Receptor CXCR4 Expressio n in Endothelium" Biochemical and Biophysical Research Commu nications, Vol. 242 (1998年1月19日 JICST受け入れ) P. 46-53	1 - 23
A	Shalley K, GUPTA et al. "Chemokine Receptors in Human Endot helial Cells" The Journal of Biological Chemistry, Vol. 273, No. 7 (1998年3月3日 JICST受け入れ) P. 4282-4287	1 - 23

THIS PAGE BLANK (USPTO)

請求の範囲4には、「CXCR4に基づく作用を阻害する有効成分として含有してなる組織を修復する剤」なる記載がされているが、当該記載は、明細書のP. 22の第20行目～第24行目の記載、要約書の記載及びその他の試験例を中心とした明細書の記載と矛盾しており、不明瞭である。

なお、国際調査報告は、請求の範囲に記載の事項に基づいて作成した。

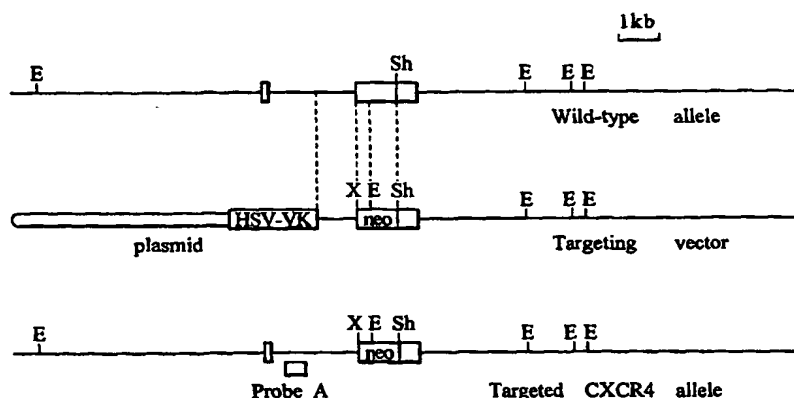
THIS PAGE BLANK (USPTO)



(51) 国際特許分類 A61K 45/00, 39/395, 48/00, 31/70, 31/56, 38/43		A1	(11) 国際公開番号 WO99/48528
			(43) 国際公開日 1999年9月30日(30.09.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/01448		(74) 代理人 弁理士 長谷川芳樹, 外(HASEGAWA, Yoshiki et al.) 〒104-0031 東京都中央区京橋二丁目13番10号 京橋ナショナルビル6F 創英国際特許法律事務所 Tokyo, (JP)	
(22) 国際出願日 1999年3月23日(23.03.99)			
(30) 優先権データ 特願平10/95448 1998年3月24日(24.03.98) JP		(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)	
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒115-8543 東京都北区浮間五丁目5番1号 Tokyo, (JP)			
(72) 発明者 岸本忠三(KISHIMOTO, Tadamitsu)[JP/JP] 〒584-0021 大阪府富田林市中野町3-5-31 Osaka, (JP)			
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 長澤氏司(NAGASAWA, Takashi)[JP/JP] 〒590-0163 大阪府堺市赤坂台一丁目50番8号 Osaka, (JP)			
(76) 出願人 ; および 橘 和延(TACHIBANA, Kazunobu)[JP/JP] 〒590-0016 大阪府堺市南花田町46-5-205 Osaka, (JP)		添付公開書類 国際調査報告書	

(54)Title: VASCULARIZATION INHIBITORS

(54)発明の名称 血管形成抑制剤



(57) Abstract

Remedies inhibiting neovascularization, remedies for solid cancer, remedies for diseases pathologically caused by neovascularization and tissue repairing agents containing as the active ingredient a substance capable of potentiating CXCR4. Based on a finding that vascularization is inhibited in a CXCR4 knockout mouse, it becomes possible to prepare remedies inhibiting vascularization which contains as the active ingredient a substance capable of potentiating CXCR4, remedies for solid cancer, remedies for diseases pathologically caused by neovascularization and tissue repairing agents containing as the active ingredient a substance capable of potentiating CXCR4. It also becomes possible to establish methods for treatment with the use of these remedies.

本発明は、新規な血管形成を抑制する治療剤、固形癌に対する治療剤、及び血管新生を病態形成要因とする疾患の治療剤、CXCR4 の作用を増強する物質を有効成分として含有する組織を修復する治療剤を提供する。

CXCR4 ノックアウトマウスにおいては血管の形成が抑制されるという知見に基づき、CXCR4 の作用を阻害する物質を有効成分として含有する血管形成を抑制する治療剤、固形癌に対する治療剤、及び血管新生を病態形成要因とする疾患の治療剤、CXCR4 の作用を増強する物質を有効成分として含有する組織を修復する治療剤が作成可能となる。また、これらの治療剤を用いた治療方法が可能となる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NZ	ニュージーランド	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク	KR	韓国				

明細書

血管形成抑制剤

技術分野

- 5 本発明は、CXCR4 阻害剤を有効成分として含有する、新規血管形成抑制剤、抗固形癌剤、また、血管新生を病態形成要因とする疾患の治療剤に関する。さらに本発明は CXCR4 増強剤を有効成分として含有する組織修復剤に関する。

背景技術

- 10 従来、腫瘍細胞が血管外に浸潤する際に、血管内皮細胞が開裂することが知られている。また、癌の増殖や転移には血管新生が深くかかわっており、腫瘍細胞が種々の血管新生因子を産生、放出することも知られている。特に、固形腫瘍の増殖には血管の新生が必須とされている。

- 15 このため血管新生を阻害する物質は新しい作用機序を有する制癌剤になる可能性があるため、ステロイド剤や微生物代謝産物などいくつかのタイプの血管新生阻害物質がすでに試みられている（「がんの浸潤・転移研究マニュアル」がん転移研究会編、金芳堂発行、1994 年、159～182 ページ）が、癌の増殖、転移をより効果的に抑制する作用を有する新規な血管新生阻害物質の発見が切望されている。

20 発明の開示

 本発明は、癌の増殖、浸潤、転移をより効果的に抑制する作用を有するケモカインレセプター阻害剤を含む血管形成抑制剤、抗固形癌剤、また、血管新生を病態形成要因とする疾患の治療剤を提供する。さらに本発明は、ケモカインレセプター増強剤を有効成分として含有する組織修復剤を提供することを目的とする。

- 25 すなわち、本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を進めた結果、CXC ケモカインであるプレ-B 細胞成長刺激因子／基質細胞誘導因子（以下

PBSF/SDF-1 または SDF-1 とする) およびケモカインレセプターである CXCR4 のノックアウトマウスを作製し、該マウスの血管の形成が抑制されること、すなわち、CXCR4 を抑制することにより血管形成が抑制されることを見出した。係る知見は、ケモカインレセプターCXCR4 が血管新生にとって必須であることを意味する。

生体組織の血管新生は、一般的に成長過程において特異的な機能を実現するため、すでに存在する血管系の再構成により起こる。初期の血管系において必須の分子は、そのほとんどがレセプターチロンシンキナーゼとそのリガンドであることが変異マウスの分析から決められてきた(Risau, W. Nature 386, 671-674 (1997)、Folkman, J. & D'Amore, P.A. Cell 87, 1158-1155 (1996)、Lindahl, P., et al., Science 277, 242-245 (1997))。しかしながら係るマウスの多くは、組織発達前の初期妊娠時に死亡することから、器官形成期の血管形成に必要な物質はいまだ不明であった。

本発明に係るケモカインレセプターCXCR4の構造は既に知られている(Bleul, C. et al. Nature 382, 829-883 (1996)、Oberlin, E. et al. Nature 382, 888-835 (1996)、Nagasawa, T. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 14726-14729 (1996))。CXCR4 は、7 回膜貫通 G タンパク共役タンパク質であり、CXC ケモカインである PBSF/SDF-1 のレセプターである。また、上記因子はBリンパ球産生、骨髓造血と心室壁形成に必要とされているものである(Nagasawa, T. et al. Nature 382, 685-688 (1996))。また、CXCR4 は、T細胞系親和性の HIV-1 のコレセプターとして機能するものでもある(Feng, Y. et al. Science 272, 872-877(1996))。CXCR4は、培養内皮細胞に発現していることも報告されている(Volin, M.V. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 242, 46-53 (1998))。

また、本発明者らは、上記 CXCR4 が、発生途上の血管内皮細胞に発現すること、CXCR4 またはそのリガンドである PBSF/SDF-1 を欠くマウスにおいては、消化器系に供給される大型の血管の形成欠陥を示すことを見出した。係る知見は、CXCR4

及び PBSF/SDF-1 シグナル系が消化管を栄養する中動静脈の形成に必須であることを意味する。さらに、本発明者らは、CXCR4 を欠くマウスは、胎生致死性であり、PGSF/SDF-1 を欠くマウスで見られるのと同様であることを見出した。係る知見は、CXCR4 が PBSF/SDF-1 の生理的に最も主要なレセプターであることを示唆するものである。

本発明者らによる以上の知見に基づき、癌組織の維持、拡大において血管形成は必須であることから、CXCR4 に基づく作用を阻害する物質は血管形成を阻害し、従って、有効な抗癌剤となることが考えられる。

また、同様に CXCR4 を阻害する物質が、血管新生が関与する疾患の治療剤となることが考えられる。

さらに、CXCR4 に基づく作用を促進することで、血管形成を促進し、血管形成が望まれる疾患の治療剤となることが考えられる。

より詳しくは、本発明は、以下にまとめたように、CXCR4 に基づく作用を阻害する物質を有効成分とする血管形成抑制剤、抗固形癌剤、血管新生を病態形成要因とする疾患の治療剤を提供する。また、本発明は CXCR4 に基づく作用を増強する物質を有効成分として含有する組織修復剤等を提供する。

すなわち、本発明は、CXCR4 阻害剤を有効成分として含有する血管形成抑制剤を提供する。

本発明はまた、CXCR4 阻害剤を有効成分として含有する抗固形癌剤を提供する。

本発明はまた、CXCR4 阻害剤を有効成分として含有する血管新生を病態形成要因とする疾患の治療剤を提供する。

本発明はまた、CXCR4 増強剤を有効成分として含有する組織修復剤を提供する。

ある大きさを越えた癌組織の維持、拡大においてこの中等大動静脈の形成は必須であるため、本発明に係る血管形成抑制剤は、CXCR4 または PBSF/SDF-1 シグナル系をブロックし、癌組織の維持、拡大を抑制するものである。

また、本発明により得られた知見は、CXCR4 及び PBSF/SDF-1 シグナル系が普

5 遍的な血管形成に働いている可能性を示唆している。従って癌の種類や血管新生を重要な病態形成要因とする疾患によっては、CXCR4 及び PBSF/SDF-1 が病態形成に深く関与している可能性があり、この場合 CXCR4 または PBSF/SDF-1 を単独または他の分子と同時にブロックすることにより、これらの疾患を抑制できる可能性がある。

なお、本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などに対する略号は、IUPAC-IUBCommission on Biochemistry Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用に基づく略号である。それらの例を以下に示す。またアミノ酸の場合は、光学異性体があり得るときは特に明示しない限り L 体を示す。

10 DNA：デオキシリボ核酸

cDNA：相補的デオキシリボ核酸

A：アデニン

T：チミン

G：グアニン

15 C：シトシン

RNA：リボ核酸

mRNA：メッセンジャーリボ核酸

G あるいは Gly：グリシン

A あるいは Ala：アラニン

20 V あるいは Val：バリン

L あるいは Leu：ロイシン

I あるいは Ile：イソロイシン

S あるいは Ser：セリン

T あるいは Thr：スレオニン

25 C あるいは Cys：システイン

M あるいは Met：メチオニン

EあるいはGlu: グルタミン酸

DあるいはAsp: アスパラギン酸

KあるいはLys: リシン

RあるいはArg: アルギニン

5 HあるいはHis: ヒスチジン

FあるいはPhe: フェニルアラニン

YあるいはTyr: チロシン

WあるいはTrp: トリプトファン

PあるいはPro: プロリン

10 NあるいはAsn; アスパラギン

QあるいはGln: グルタミン

BSA: ウシ血清アルブミン

FBS: ウシ胎児血清

PBS: リン酸緩衝生理食塩水

15 SDS: ドデシル硫酸ナトリウム

図面の簡単な説明

図1は、CXCR4 遺伝子の標的戦略を示す図である。ここで、上は野生型 CXCR4 対立遺伝子を、中は、標的ベクターを、および下は、予想変異対立遺伝子を示す。また、遺伝子の翻訳領域は黒四角で示される。白四角は5' および3' 非翻訳領域を示す。点線は、標的ベクターに使用された相同な断片を示す。プローブAは、サザンハイブリダイゼーション用の外部プローブである。制限酵素位置はそれぞれ、E、EcoRI; Sh、SphI; X、XhoIである。

図2Aは、野生型(+/+)およびヘテロ変異(+/-)マウスのテールDNAのサザンブロット分析を示す写真である。プローブAにより同定された、11.8kb 野生型および8.2kb 標的対立遺伝子のEcoRI-EcoRI断片が示されている。

図 2 B は、CXCR4 発現の RT-PCR 増幅分析を示す写真である。全 RNA は E18.5 の野生型およびホモ変異胚から調製し、さらに CXCR4 特異的プライマーで増幅した。RT-PCR 増幅はまた、増幅可能な RNA の存在のコントロールとして、普遍的に発現している G3PDH mRNA を用いた。

5 図 3 は、野生型の CXCR4^{-/-}胚における E13.5 での腸間膜と中腸ループ領域での胃腸系血管欠損を示すものであり、腸間膜および腸の抗 PECAM-1 抗体による免疫染色を示す写真である。矢印は、野生型腸間膜の小腸に供給する上腸間膜動脈又は静脈よりの大分枝を示す。du は十二指腸、p は中間腸ループの近位を、dm は中間腸ループの末梢部を示す。

10 図 4 は、野生型の CXCR4^{-/-}胚における E13.5 での腸間膜の断面での胃腸系血管欠損を示すものであり、腸間膜および腸の抗 PECAM-1 抗体による免疫染色を示す写真である。a は動脈、v は静脈を示す。

図 5 は、野生型の CXCR4^{-/-}胚における E17.5 での空腸での胃腸系血管欠損を示すものであり、腸間膜および腸の抗 PECAM-1 抗体による免疫染色を示す写真である。矢印は、野生型腸間膜の小腸に供給する上腸間膜動脈又は静脈よりの大分枝を示す。

15 図 6 は、野生型の CXCR4^{-/-}胚における E17.5 でのより遠位の空腸での胃腸系血管欠損を示すものであり、腸間膜および腸の抗 PECAM-1 抗体による免疫染色を示す写真である。矢印は、野生型腸間膜の小腸に供給する上腸間膜動脈又は静脈よりの大分枝を示す。

20 図 7 は、変異型の CXCR4^{-/-}胚における E13.5 での腸間膜と中腸ループ領域での胃腸系血管欠損を示すものであり、変異型の腸間膜および腸の抗 PECAM-1 抗体による免疫染色を示す写真である。p は中間腸ループの近位を、dm は中間腸ループの末梢部を示す。

25 図 8 は、変異型の CXCR4^{-/-}胚における E13.5 での染色した腸間膜の断面での胃腸系血管欠損を示すものであり、変異型の腸間膜および腸の抗 PECAM-1 抗体に

よる免疫染色を示す写真である。

図 9 は、変異型の CXCR4^{-/-}胚における E17.5 での空腸での胃腸系血管欠損を示すものであり、変異型の腸間膜および腸の抗 PECAM-1 抗体による免疫染色を示す写真である。

5 図 10 は、変異型の CXCR4^{-/-}胚における E17.5 でのより遠位の空腸での胃腸系血管欠損を示すものであり、変異型の腸間膜および腸の抗 PECAM-1 抗体による免疫染色を示す写真である。

図 11 は、変異型の CXCR4^{-/-}胚における E16.5 での変異マウスの未染色の腸出血様病変の胃腸系血管欠損を示すものであり、変異型の腸間膜および腸の抗
10 PECAM-1 抗体による免疫染色を示す写真である。

図 12 A は、野生型、E13.5 での抗 PECAM-1 抗体による胃の免疫染色の結果を示す写真である。矢印は野生型にのみ観察される大型の血管を示す。

図 12 B は、変異型、E13.5 での抗 PECAM-1 抗体による胃の免疫染色の結果を示す写真である。

15 図 12 C は、野生型、E15.5 での抗 PECAM-1 抗体による胃の免疫染色の結果を示す写真である。写真内に挿入された写真は、E15.5 での染色した胃の壁内の大型の血管のヘマトキシリン-エオジン染色された断面を示す。矢印は野生型にのみ観察される大型の血管を示す。

図 12 D は、変異型、E15.5 での抗 PECAM-1 抗体による胃の免疫染色の結果を示す写真である。
20

図 13 A は in situ ハイブリダイゼーションによる胃腸組織での CXCR4 および PBSF/SDF-1 の発現を示す写真である。野生型の中腸ループにつながる腸間膜の連続切片において、ヘマトキシリン-エオジンで染色した。m は、腸間膜、i は、小腸、a は上腸間膜動脈、v は上腸間静脈を示す。

25 図 13 B は in situ ハイブリダイゼーションによる胃腸組織での CXCR4 および PBSF/SDF-1 の発現を示す写真である。CXCR4 特異的プローブとハイブリダイ

ズした。矢印矢頭は、腸間膜血管の染色された内皮細胞を示す。

図 1 3 C は in situ ハイブリダイゼーションによる胃腸組織での CXCR4 および PBSF/SDF-1 の発現を示す写真である。PBSF/SDF-1 特異的プローブとハイブリダイズした。腸間膜内の内皮細胞を取り巻く間葉細胞に PBSF/SDF-1 が発現している。

図 1 3 D は in situ ハイブリダイゼーションによる胃腸組織での CXCR4 および PBSF/SDF-1 の発現を示す写真である。野生型の中腸ループにつながる腸間膜の連続切片において、ヘマトキシリン-エオジンで染色した。図 1 3 D は、図 1 3 A の上腸間膜動脈から生じる血管の拡大図であり、血管内皮細胞に CXCR4 の強い発現を認めた。

図 1 3 E は in situ ハイブリダイゼーションによる胃腸組織での CXCR4 および PBSF/SDF-1 の発現を示す写真である。CXCR4 特異的プローブとハイブリダイズした。図 1 3 E は、図 1 3 B の上腸間膜動脈から生じる血管の拡大図であり、血管内皮細胞に CXCR4 の強い発現を認めた。矢印矢頭は、腸間膜血管の染色された内皮細胞を示す。

図 1 3 F は in situ ハイブリダイゼーションによる胃腸組織での CXCR4 および PBSF/SDF-1 の発現を示す写真である。野生型 E18.5 胚の骨髄の断面であり、造血細胞に CXCR4 が発現し、紡錘型のストローマ細胞には発現していない。

発明を実施するための最良の形態

本発明に係る血管形成抑制剤、抗固形癌剤、又は血管新生を病態形成要因とする疾患の治療剤は、ケモカインレセプターである CXCR4 の作用を阻害する物質を有効成分として含む。また、本発明に係る組織修復剤は、該 CXCR4 の作用を増強する物質を有効成分として含有する。

CXCR4 のアミノ酸配列については、すでに知られている。具体的にはヒト CXCR4 及びマウス CXCR4 のアミノ酸配列は、各々配列番号 1 及び 3 に示される。また、

ヒト CXCR4 及びマウス CXCR4 の塩基配列は、各々配列番号 2（塩基位置 1～1056）及び 4（塩基位置 1～1077）に示される。

CXCR4 に結合するリガンドである SDF-1 についても既にそのアミノ酸配列が知られている。SDF-1 にはアミノ酸配列の長さが異なる 2 種類、すなわち SDF-1- α 及び SDF-1- β が存在する。具体的にはヒト SDF-1- α のアミノ酸配列は配列番号 5 に、塩基配列は配列番号：6（塩基位置 474～740）に示される。ヒト SDF-1- β は、ヒト SDF-1- α の C 末端側にさらに 4 つのアミノ酸残基 Arg、Phe、Lys、Met（配列番号：9）が付加されている。

マウス SDF-1- α のアミノ酸配列は配列番号：7 に、塩基配列は配列番号：8（塩基位置 82～348）に示される。マウス SDF-1- β は、マウス SDF-1- α の C 末端側にさらに 4 つのアミノ酸残基 Arg、Leu、Lys、Met（配列番号：10）が付加されている。ヒト及びマウス SDF-1 はアミノ酸 1 位の Met から 21 位の Gly までがシグナル配列である。

これまでに知られている CXC ケモカインとしては、前記 PBSF/SDF-1 の他、IL-8（Yoshimura, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 9233-9237 (1987)）、NAP-2（Walz, A. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 159, 969-975 (1989)）、NAP-4, GRO α （Richmondo, A. et al., J. Cell. Biochem., 36, 185-198 (1988)）、GRO β （Haskill, S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 77732-7736 (1990)）、GRO γ （Haskill, S. et al., (1990) 前出）、GCP-2（Proost, P. et al., J. Immunol., 150, 1000-1010 (1993)）、ENA-78（Wayz, A. et al., J. Exp. Med., 174, 1355-1362 (1991)）、PF-4（Deuel, T.F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 2256-2258 (1977)）、及び IP-10（Dewald, B. et al., Immunol. Lett., 32, 81-84 (1992)）が挙げられる。

本発明において使用可能な CXCR4 に基づく作用を阻害する物質については特に限定はされず、CXCR4 に基づく作用を阻害し、結果として血管新生を阻害する物質であればよい。

具体的には、(i)リガンド (SDF-1) とレセプター (CXCR4) との結合自体を阻害することに基づく物質、(ii)CXCR4 から核へのシグナル伝達を阻害することに基づく物質、(iii)CXCR4 自体の発現を阻害する物質、(iv)SDF-1 自体の発現を阻害する物質、が挙げられる。

- 5 (i)SDF-1 と CXCR4 との結合自体を阻害する物質として、SDF-1 を阻害する物質と CXCR4 を阻害する物質がある。

SDF-1 を阻害する物質は、より具体的には CXCR4 に対し SDF-1 と拮抗的に競合し阻害する物質と SDF-1 に結合して CXCR4 への SDF-1 の結合を阻害する物質がある。CXCR4 に対し SDF-1 と拮抗的に競合し阻害する物質として、具体的には SDF-1 と類似の構造を有する蛋白質、その蛋白質と他のペプチド又はポリペプチドとの融合蛋白質、SDF-1 の部分ペプチド及び SDF-1 の結合部位と類似の構造を有する低分子化合物等が挙げられる。

10 SDF-1 に結合して CXCR4 への SDF-1 の結合を阻害する物質として、具体的には抗 SDF-1 抗体、その結合活性を有する抗体断片、SDF-1 に対する結合活性を有する融合タンパク質、SDF-1 の構造変化を誘導する物質、及び SDF-1 の CXCR4 との結合部位に結合する低分子化合物等が挙げられる。

15 CXCR4 を阻害する物質は、より具体的には SDF-1 との結合において CXCR4 と拮抗的に競合して阻害する物質と CXCR4 に結合して SDF-1 の CXCR4 への結合を阻害する物質がある。SDF-1 との結合において CXCR4 と拮抗的に競合して阻害する物質として、具体的には CXCR4 と拮抗的に阻害する可溶性 CXCR4、CXCR4 と類似の構造を有するタンパク質、そのタンパク質と他のペプチド又はポリペプチドとの融合タンパク質、又は CXCR4 部分ペプチド及び CXCR4 の結合部位と類似の構造を有する低分子化合物等が挙げられる。

20 CXCR4 に結合して SDF-1 の CXCR4 への結合を阻害する物質として、具体的には抗 CXCR4 抗体、その結合活性を有する抗体断片、CXCR4 に対する結合活性を有する融合タンパク質、SDF-1 の構造変化を誘導する物質及び CXCR4 の SDF-1 結合部

位に結合する低分子化合物等が挙げられる。

SDF-1 と CXCR4 との結合自体を阻害する物質の具体例は、T22(T.Murakami, et al. J.Exp.Med.,186, 1389-1393(1997)、ALX40-4C(J.Exp.Med.,186, 1395-1400(1997)、AMD3100 (J.Exp.Med., 186, 1383-1388(1997), Nat.Med.,4,72-77(1998)) 等である。これらの物質の作成方法については、例えば J.Exp.Med.,186, 1189-1191(1997)に記載の方法に準じて可能である。

(ii) CXCR4 から核へのシグナル伝達を阻害することに基づく物質としては、係る作用を有する物質であれば特に制限はない。CXCR4 から核へのシグナル伝達を阻害することに基づく物質としては、G タンパク共役タンパク質の下流に存在するシグナル伝達系の阻害剤、例えば MAPK カスケード阻害剤、ホスホライペー
10 ス C (PLC) の阻害剤、PI3 キナーゼ基ナーゼ阻害剤等が挙げられる。

(iii)CXCR4 自体の発現を阻害する物質として、細胞上からみかけ上 CXCR4 を消失させる物質及び CXCR4 自体の発現を阻害する物質が挙げられる。細胞上からみかけ上 CXCR4 を消失させる物質とは、具体的には CXCR4 のダウンレギュレーションを誘導する物質である。CXCR4 のダウンレギュレーションの誘導とは、具体的には細胞膜に作用して細胞膜の流動性を変化させ、細胞膜上から CXCR4 を消失させる作用を意味する。このような作用を有する物質として、例えばデキサメタ
15 ゾン等が挙げられる。

CXCR4 自体の発現を阻害する物質として、具体的にはアンチジーン、アンチセンス (アンチセンスオリゴヌクレオチド、アンチセンスベクターにより発現されるアンチセンス RNA)、リボザイム及び CXCR4 の発現調節部位、例えばプロモーターやエンハンサー等に対し阻害する物質が挙げられる。

後述の実施例において、CXCR4 遺伝子の一部を含むベクターを用いて CXCR4 を欠損させたことにより、血管形成が抑制されたことが明らかとなった。従って、
25 CXCR4 のアンチジーン、アンチセンス又はリボザイム等により CXCR4 を阻害すれば、血管形成が抑制される。

本発明で好ましく使用可能なアンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、CXCR4 遺伝子、CXCR4 に対する SDF-1 の遺伝子、又は CXCR4 に基づくシグナル系に関わる物質の遺伝子と選択的にハイブリダイズし得るヌクレオチド (DNA 又は RNA) 又はヌクレオチド誘導体、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド等が含まれる。

5 本発明は例えば、配列番号：2 に示されるヒト CXCR4 遺伝子の塩基配列中のいずれかの箇所にハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。

このアンチセンスオリゴヌクレオチドは、好ましくは配列番号：2 に示される塩基配列中の連続する少なくとも 20 個以上のヌクレオチドに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。さらに好ましくは、前記連続する少なくとも 20

10 個以上のヌクレオチドが翻訳開始コドンを含む、前記のアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

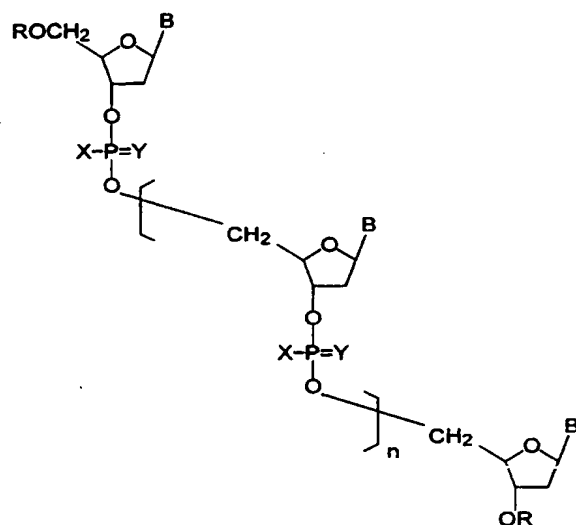
ここでいう「アンチセンスオリゴヌクレオチド」とは、DNA 又は mRNA の所定の領域を構成するヌクレオチドに対応するヌクレオチドが全て相補的であるもののみならず、DNA 又は mRNA とオリゴヌクレオチドとが配列番号：2 に示される塩基配列に選択的に安定にハイブリダイズできる限り、1 又は複数個のヌクレオチドのミスマッチが存在していてもよい。選択的に安定にハイブリダイズするとは、少なくとも 20 個、好ましくは 30 個の連続したヌクレオチド配列領域で、少なくとも 70%、好ましくは少なくとも 80%、より好ましくは 90%、さらに好ましくは 95% 以上の塩基配列上の相同性を有するものを示す。尚、本明細書にお

15

20 いて相同性とは同等性 (Identity) を示す。

本発明において使用されるオリゴヌクレオチド誘導体がデオキシリボヌクレオチドの場合、各々の構造は化 1 に示したとおりである。

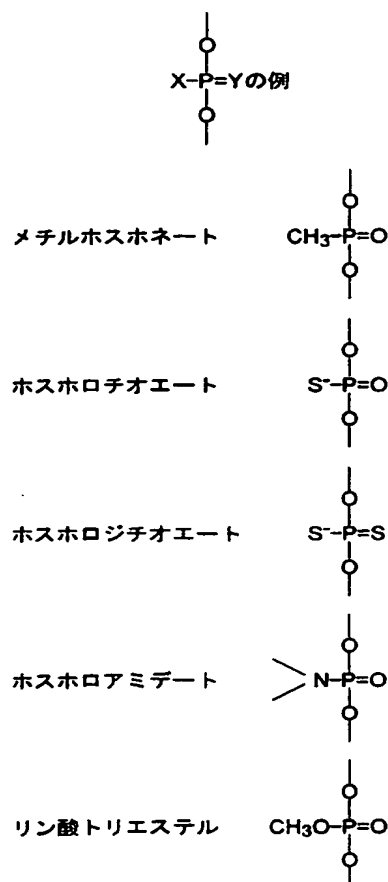
(化1)



ここで、X は独立して酸素 (O)、イオウ (S)、低級アルキル基あるいは一級アミン又は二級アミンのいずれであってもよい。Y は独立して酸素 (O) あるいはイオウ (S) のいずれでもよい、B はアデニン、グアニン、チミン、あるいはシトシンのいずれかから選ばれ、主としてヒト CXCR4 遺伝子の DNA 又は mRNA の相補的オリゴヌクレオチドである。R は独立して水素 (H) 又はジメトキシトリチル基あるいは低級アルキル基である。n は 7-28 である。

好ましいオリゴヌクレオチド誘導体としては、修飾されていないオリゴヌクレオチドだけではなく、下に示すごとく、修飾されたオリゴヌクレオチドでもよい。このような修飾体として、例えばメチルホスホネート型又はエチルホスホネート型のような低級アルキルホスホネート修飾体、ホスホロチオエート修飾体又はホスホロアミデート修飾体等が挙げられる。

(化2)



これらのオリゴヌクレオチド修飾体は、次の通り常法により得ることができる。
 化1のX及びYがOであるオリゴヌクレオチドは市販のDNA合成装置、例えば
 Applied Biosystems製によって容易に合成される、合成方法はホスホロアミ
 5 トを用いた固相合成法、ハイドロジェンホスホネートを用いた固相合成法等で得
 ることができる。

Xが低級アルコキシ基であるリン酸トリエステル修飾体は、常法、例えば化学
 合成で得られたオリゴヌクレオチドをトシルクロリドのDMF/メタノール/2, 6
 ールチジン溶液で処理することにより得ることができる。Xがアルキル基である
 10 アルキルホスホネート修飾体は、常法、例えばホスホアミダイトを用いて得るこ
 とができる。XがSであるホスホロチオエート修飾体は、常法、例えばイオウを

用いた固相合成法あるいはテトラエチルチウラムジスルフィドを用いて、固相合成法により得ることができる。X、Y が共に S であるホスホロジチオエート修飾体は、例えばビスアミダイトをチオアミダイトに変換し、イオウを作用させることにより固相合成法により得ることができる。X が一級アミンあるいは二級アミンであるホスホロアミデート修飾体は、例えばハイドロジェンホスホネートを一級あるいは二級アミンで処理することにより固相合成法により得ることができる。あるいは、アミダイトを tert-ブチルハイドロパーオキサイドで酸化しても得ることができる。

精製及び純度確認は、高速液体クロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で行うことができる。分子量の確認は、Electrospray Ionization Mass Spectrometry 又は Fast Atom Bombardment-Mass Spectrometry で行うことができる。

本発明で使用するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、CXCR4 レセプター又はそのリガンド、さらに CXCR4 に基づくシグナル伝達物質の産生細胞に作用して、該ポリペプチドをコードする DNA 又は mRNA に結合することにより、その転写又は翻訳を阻害したり、mRNA の分解を促進したりして、該ポリペプチドの発現を抑制することにより、結果的に CXCR4 に基づく作用を阻害する効果を有する。

本発明で使用するアンチセンスオリゴヌクレオチドは結果として血管の新生を阻害することにおいて有用である。また、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含有する血管新生阻害剤は、癌、特に固形癌の治療剤として有用である。

CXCR4 アンチセンスベクターを作製するには、通常用いられる方法に従えばよい。すなわち、CXCR4 をコードする cDNA を AAV ベクター (アデノ随伴ベクター)、MLV ベクター (マウス白血病ウィルスベクター)、又は HIV ベクター等にアンチセンス方向に連結する。アンチセンス方向とは、プロモーターの下流に導入する

cDNA の 3' 側から連結することを意味する。これらのベクターに含まれる cDNA から合成されたアンチセンス RNA は、宿主の CXCR4 の発現を構成的に抑制する。

アンチセンス DNA 又は RNA は、例えばリポソーム法、HVJ リポソーム法、正電荷リポソーム法等の手段を用いて細胞に導入することができる。CXCR4 アンチセンス DNA 又は RNA を導入することにより、構成的に CXCR4 の発現を阻害する事が可能である。

(iv)CXCR4 に対する SDF-1 自体の発現を阻害する物質として、SDF-1 の発現阻害のためのアンチセンス及び SDF-1 の発現調節部位、例えばプロモーター等に対し阻害する物質が挙げられる。

上述した本発明で使用可能な抗体、例えば抗 SDF-1 抗体又は抗 CXCR4 抗体は、公知の手段を用いてポリクローナルまたはモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で使用される抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマに産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に産生されるものがある。この抗体は上述の性質を有する抗体である。

抗体産生ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、所望の抗原を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナル抗体産生細胞をクローニングする。

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。

前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物のミエローマ細胞は、

すでに、公知の種々の細胞株が適宜使用される。前記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は基本的には公知の方法、たとえば、ミルステインらの方法 (Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73 : 3-46) 等に準じて行うことができる。

5 得られたハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えば、HAT 培養液 (ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液) で培養することにより選択される。当該 HAT 培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞 (非融合細胞) が死滅するのに十分な時間、通常数日～数週間継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよびクローニングが行われる。このように得られたハイブリドーマから通常用いられる方法に従い抗体を取得すればよい。

10 また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球を *in vitro* で所望の抗原蛋白質または抗原発現細胞で感作し、感作 B リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えば U266 と融合させ、所望の抗原または抗原発現細胞への結合活性を育する所望のヒト抗体を得ることもできる。さらに、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを育するトランスジェニック動物に抗原または抗原発現細胞を投与し、前述の方法に従い所望のヒト抗体を取得してもよい。

15 本発明には、モノクローナル抗体として、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体を用いることができる (例えば、Carl, A.K.Borrenbaeck, James, W. Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD 1990 参照)。

20 また、本発明には、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ (Chimeric) 抗体 (欧州特許出願公開番号 EP125023)、ヒト型化 (Humanized) 抗体 (欧州特許出願公開番号 EP125023) を使用できる。これらの抗体は、既知の方法を用いて製造する

ことができる。

キメラ抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の可変領域とヒト抗体由来の定常領域 (C 領域) からなり、ヒト型化抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の相補性決定領域とヒト抗体由来のフレームワーク領域 (framework region ; FR) および
5 C 領域からなり、ヒト体内における抗原性が低下しているため、本発明における有効成分として有用である。

本発明で使用される抗体は、本発明に好適に使用され得るかぎり、抗体の断片やその修飾物であってよい。例えば、抗体の断片としては、Fab、F (ab')₂、Fv
または H 鎖と L 鎖の Fv を適当なリンカーで連結させたシングルチェーン Fv
10 (scFv) が挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、または、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる。

発明に使用される抗体を取得するために、ファージライブラリー法を用いることができる。(Marks, C. et al., The New England Journal Medicine 335,
15 730-733) 例えばヒト B 細胞よりヒト抗体 V 領域、例えば scFv をコードする遺伝子からなる cDNA ライブラリーを得、この cDNA ライブラリーをファージベクターに、例えば M13 ファージ表面提示ベクターに導入し、これを大腸菌に感染させる。大腸菌で cDNA ライブラリーは発現され、細胞表面に抗体 V 領域が産生される。所望の抗原をコートしたプレートに上で、抗原結合活性に基づいて選択すること
20 により、所望の抗体をコードする遺伝子を得ることができる。

ファージライブラリー法を応用してチェーンシャッフリング法を用い、抗原に対しより強い結合活性を有する抗体を得ることができる。(Akamatsu, Y. & Tsurushita, N. Medical Immunology 27, 273-286 (1994))。すなわち、いったん分離した抗体遺伝子の V 領域の一方 (例えば VH) を固定し、B 細胞から調製したもう一方 (例えば VL) 混合体との間で新たにライブラリーを作製し、抗原により強く結合するクローンを分離すればよい。

また、抗体のアミノ酸配列に人為的突然変異を導入することによっても、抗原に対しより強い結合活性を有する抗体を得ることができる。(Akamatsu, Y. & Tsurushita, N. Medical Immunology 27, 273-286 (1994))。すなわち、クローニングした抗体 V 領域をコードする遺伝子に突然変異を導入し、この遺伝子を上記ファージライブラリー法で発現させることにより、抗原に対しより強い結合活性を有する抗体をコードする遺伝子を得ることができる。

これら抗体の断片は、前記と同様にしてその遺伝子を取得し発現させ、宿主により産生させることができる。本明細書でいう「抗体」にはこれらの抗体の断片も包含される。

抗体の修飾物として、ポリエチレングリコール (PEG) 等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。本明細書でいう「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野においてすでに確立されている。

前記のように発現・産生された抗体は、通常用いられる方法に従い、宿主細胞内外から分離し均一にまで精製することができる。また、濃度測定は吸光度の測定または ELISA 等により行うことができる。

本発明で使用される CXCR4 阻害物質として、SDF-1 又は CXCR4 と類似の構造を有するタンパク質 (類似構造タンパク質) が挙げられる。この物質は、SDF-1 又は CXCR4 との結合活性を有し、且つその生物学的活性を伝達しない物質である。即ち CXCR4 に対し SDF-1 と競合的に結合するが、SDF-1 の生物学的活性を伝達しないため、SDF-1 によるシグナル伝達を遮断する。

SDF-1 類似構造タンパク質は、SDF-1 のアミノ酸配列のアミノ酸残基を置換することにより変異を導入して作製される。SDF-1 類似構造タンパク質のもととなる SDF-1 はその由来を問わないが、抗原性等を考慮すれば、好ましくはヒト SDF-1 である。具体的には、SDF-1 のアミノ酸配列を公知の分子モデリングプログラム、

たとえば、WHATIF (Vriend et al., J. Mol. Graphics (1990) 8, 52-56) を用いてその二次構造を予測し、さらに置換されるアミノ酸残基の全体に及ぼす影響を評価することにより行われる。

適切な置換アミノ酸残基を決定した後、ヒト SDF-1 遺伝子をコードする塩基配列を含むベクターを鋳型として、通常行われる PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) 法によりアミノ酸が置換されるように変異を導入することにより、SDF-1 類似構造タンパク質をコードする遺伝子が得られる。これを必要に応じて適当な発現ベクターに組み込み、前記組換え型抗体の発現、産生及び精製方法に準じて SDF-1 類似構造タンパク質を得ることができる。SDF-1 類似構造タンパク質として、N 末端を欠失させた SDF-1 が知られている (EMBO J. (1997) 16, 6996-7007)。

本発明で使用する SDF-1 部分ペプチド又は CXCR4 部分ペプチドは、各々 CXCR4 あるいは SDF-1 との結合活性を有し、且つ SDF-1 の生物学的活性を伝達しない物質である。即ち、SDF-1 部分ペプチド又は CXCR4 部分ペプチドは CXCR4 又は SDF-1 に結合し、これらを捕捉することにより SDF-1 の CXCR4 への結合を特異的に阻害する。

その結果、SDF-1 の生物学的活性を伝達しないため、SDF-1 によるシグナル伝達を遮断する。

SDF-1 部分ペプチド又は CXCR4 部分ペプチドは、SDF-1 又は CXCR4 のアミノ酸配列において SDF-1 と CXCR4 との結合に係わる領域の一部又は全部のアミノ酸配列からなるペプチドである。このようなペプチドは、通常 10～80、好ましくは 20～50、より好ましくは 20～40 個のアミノ酸残基からなる。

SDF-1 部分ペプチド又は CXCR4 部分ペプチドは、SDF-1 又は CXCR4 のアミノ酸配列において、SDF-1 と CXCR4 との結合に係わる領域を特定し、その一部又は全部のアミノ酸配列を通常知られる方法、例えば遺伝子工学的手法又はペプチド合成法により作製することができる。

SDF-1 部分ペプチド又は CXCR4 部分ペプチドを遺伝子工学的手法により作製するには、所望のペプチドをコードする DNA 配列を発現ベクターに組み込み、前記組換え型抗体の発現、産生及び精製方法に準じて得ることができる。

5 SDF-1 部分ペプチド又は CXCR4 部分ペプチドをペプチド合成法により作製するには、ペプチド合成において通常用いられている方法、例えば固相合成法又は液相合成法を用いることができる。具体的には、続医薬品の開発第 14 巻ペプチド合成 監修矢島治明廣川書店 1991 年に記載の方法に準じて行えばよい。固相合成法としては、例えば有機溶媒に不溶性である支持体に合成しようとするペプチドの C 末端に対応するアミノ酸を結合させ、 α -アミノ基及び側鎖官能基を適切
10 な保護基で保護したアミノ酸を C 末端から N 末端方向の順番に 1 アミノ酸ずつ縮合させる反応と樹脂上に結合したアミノ酸又はペプチドの α -アミノ基の該保護基を脱離させる反応を交互に繰り返すことにより、ペプチド鎖を伸長させる方法が用いられる。固相ペプチド合成法は、用いられる保護基の種類により Boc 法と Fmoc 法に大別される。

15 このようにして目的とするペプチドを合成した後、脱保護反応及びペプチド鎖の支持体から切断する。ペプチド鎖との切断反応には、Boc 法ではフッ化水素又はトリフルオロメタンスルホン酸を、又 Fmoc 法では TFA を通常用いることができる。Boc 法では、例えばフッ化水素中で上記保護ペプチド樹脂をアニソール存在下で処理する。次いで、保護基の脱離と支持体から切断しペプチドを回収する。

20 これを凍結乾燥することにより、粗ペプチドが得られる。一方、Fmoc 法では、例えば TFA 中で上記と同様の操作で脱保護反応及びペプチド鎖の支持体から切断反応を行うことができる。

得られた粗ペプチドは、HPLC に適用することにより分離、精製することができる。その溶出にあたり、蛋白質の精製に通常用いられる水-アセトニトリル系
25 溶媒を使用して最適条件下で行えばよい。得られたクロマトグラフィーのプロファイルのピークに該当する画分を分取し、これを凍結乾燥する。このようにして

精製したペプチド画分について、マスマススペクトル分析による分子量解析、アミノ酸組成分析、又はアミノ酸配列解析等により同定する。

5 本発明で使用される SDF-1 の部分ペプチドあるいは CXCR4 の部分ペプチドは、各々 CXCR4 あるいは SDF-1 に結合し、シグナルの伝達活性がないものであれば、その配列を問わない。SDF-1 の部分ペプチドおよび CXCR4 のペプチドについては、既に知られたアミノ酸配列を使用できる。例えば、リガンドとして SDF-1 の場合、配列表の配列番号 5（ヒト）、および 7（マウス）に記載されたアミノ酸配列が使用可能である。

10 本発明において使用可能な CXCR4 に基づく作用を増強する物質については特に限定されないが、SDF-1 を増強する物質として、SDF-1 自体、SDF-1 のアゴニスト、又は SDF-1 の発現増強剤が挙げられる。さらに、レセプター CXCR4 を増強する物質としては、CXCR4 自体、そのアゴニスト、又は CXCR4 の発現増強剤が挙げられる。

15 上記説明したように、本発明に係る CXCR4 阻害剤を有効成分として含む血管形成抑制剤を用いることにより、血管形成 (Vascularization) を抑制可能となることから、固形癌に対する抗腫瘍効果（血管新生の抑制）血管肉腫（血管自体の癌）カポシ肉腫に対して抗腫瘍効果が発揮される。また、血管新生を病態形成要因とする疾患、具体的には慢性関節リウマチ、乾せん (psoriasis)、糖尿病性網膜症に対して治療効果が発揮される。

20 CXCR4 の作用を増強する物質を含む血管新生を病態形成要因とする疾患の治療剤を用いることにより、血管新生を促進させることが可能となり、心筋梗塞、術後の血管新生を伴う疾患、具体的には創傷治癒、骨の修復及びリモデリング (remodeling)、軟骨の修復、毛髪成長、心筋梗塞、脳梗塞および脳における外傷に対する治療効果が発揮される。

25 本発明において使用可能な血管新生阻害及び促進試験法は血管新生試験法を用い行える。このアッセイ方法についても特に制限はなく、通常公知の方法が好ま

しく使用できる（「がんの浸潤・転移研究マニュアル」がん転移研究会編、金芳堂発行、1994年、159～182ページ）。具体的には、(i)血管内皮細胞への影響を、腫瘍細胞が血管外に浸潤する際、血管内皮細胞が開裂するという知見に基づく血管内皮細胞間隔の開裂を測定する方法（FITC-dextranの透過性から）、(ii)血管新生誘導因子としてその役割を生体内で発揮する候補因子を同定するための *invivo* 測定法として知られている角膜法、及び(iv)CAM法（chickembryochorioallantoic membrane）、(v)肉眼で誘導血管の量を測定する背部皮下法、(vi)血管内皮細胞の管腔形成の測定方法等が挙げられる。

抗腫瘍効果の確認には、移植モデルや移植転移モデルを用いた *in vivo* 実験又は癌細胞 *in vitro* 実験が挙げられる。具体的には、「がんの浸潤・転移研究マニュアル」がん転移研究会編、金芳堂発行、1994年、7～158ページに記載の方法を使用することができる。

本発明に係る血管形成抑制剤、抗固形癌剤、治療剤、組織修復剤等は、経口的に全身あるいは局所的に投与することができる。例えば、点滴などの静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射を選択することができ、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。

有効投与量は、一回につき体重1kgあたり0.09mgから100mgの範囲で選ばれる。あるいは、患者あたり1～1000mg、好ましくは5～50mgの投与量を選ぶことができる。

本発明に係る血管形成抑制剤、抗固形癌剤、治療剤、組織修復剤等は、投与経路次第で医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。このような担体および添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶媒、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴ

ム、カゼイン、ゼラチン、寒天、ジグリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン (HSA)、マンニトール、ソルビトニル、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤などが挙げられる。

- 5 使用される添加物は、剤型に応じて上記の中から適宜あるいは組合せて選択されるが、これらに限定されるものではない。

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの例によって何等限定されるものではない。

10 実施例

CXCR4 完全欠損マウスの作製および分析

CXCR4 遺伝子座を含むゲノム DNA を、マウス株 129DNA ライブラリー(Stratagene 社)から単離した。

- 15 エクソン 2 の 5' 翻訳領域を含む 1.1kb ゲノム断片をネオマイシン耐性遺伝子で置き換え、ヘルペスシンプレックスチミジンキナーゼ遺伝子を 5' 末端に連結した。

胚形成の 14.1 日 (以下、E14.1 とする) の細胞内に標的ベクターをエレクトロポレーションにより導入し、G418 とガンシクロビルにより相同性組換えを選択し、PCR で同定した。

- 20 変異座の構造と ES 細胞コロニーでの単一の挿入物の存在をサザンハイブリダイゼーションで確認した。Nagasawa, T. et al.. Nature 382, 685-688 (1996) に記載の方法にしたがい、未分化胚芽細胞の注入により変異マウスを作製するために変異 ES 細胞コロニーを用いた。

- 25 サザンハイブリダイゼーション分析のため、テール DNA を EcoRI で消化し、ナイロンメンブレンに移し、5' 側相同領域の 550bp のプローブ A とハイブリダイズさせた。

E18.5 の胚の胎仔肝臓から単離した $3\mu\text{g}$ の全 RNA を出発材料として標準の方法に従い RT-PCR を 40 サイクル行った。630bp の PCR 産物を CXCR4 特異的プライマー, すなわち前方プライマー (配列番号: 11) 及び後方プライマー (配列番号: 12) を用いて増幅した。組織学的分析及びフローサイトメトリー分析は
5 Nagasawa, T. et al. Nature 382, 685-688 (1996) に記載の方法に準じて行った。

免疫組織学的染色は、Adachi, S., Yoshida, H., Kataoka, H. Nishikawa, S.-I. Int. Immunol. 9, 507-514 の方法に準じた。胚及び器官の切片を 4% パラホルムアルデヒドで固定し、メタノールで脱水し、メタノール中 30% 過酸化水素で脱色
10 し、再度水和した。

PBSMT (1% スキムミルク粉および 0.3% v/v TritonX-100 を含む PBS) でインキュベートした後、試料を PBSMT 中、1:250 希釈した抗-PECAM 抗体 (PharMingen) と 4°C 一晩インキュベートした後、PBSMT で洗浄し、1:500 希釈ホースラディッシュパーオキシダーゼ標識抗ラット Ig 抗体 (Biosource 製) と PBSMT 中 4°C 一晩インキュ
15 ベートした。

その後、試料をよく洗浄し、胚を $250\mu\text{g}/\text{ml}$ ジアミノベンジジン (同仁化学製)、0.08% NiCl_2 を含む PBS 中で 30 分インキュベートした。過酸化水素を加えて、最終濃度 0.01% としてパーオキシダーゼ染色を行った。反応は約 30 分後に止めた。

20 Nagasawa, T. et al. Nature 382, 685-688 (1996) に記載の方法により、マウス CXCR4 又は PBSF/SDF-1cDNA の断片をプローブとしてアンチセンス転写を用いて行った。

CXCR4 の生理的機能を決定するため、CXCR4 欠損マウスを作製した。すなわち、CXCR4 遺伝子のうち、レセプター機能に重要なすべての膜貫通領域を含むエクソン 2 の大部分を削除し、その部分をネオマイシン耐性遺伝子 (neo) で置換できるようにしたターゲットベクターを構築した。この結果、相同組換え後、実質的に
25

CXCR4 遺伝子が完全に削除されることとなる。

図 1 は、CXCR4 遺伝子の標的戦略を示す図（上、中、下とする）である。上には、野生型 CXCR4 対立遺伝子、中には標的ベクター、および下には予想変異対立遺伝子を示す。遺伝子の翻訳領域は黒四角で示される。白四角は 5' および 3' 非翻訳領域を示す。点線は、標的ベクターに使用された相同な断片を示す。プローブ A は、サザンハイブリダイゼーション用の外部プローブである。ここで制限酵素位置をそれぞれ、E、EcoRI ; Sh、SphI ; X、XhoI とした。

図 2 A は、野生型(+/+)およびヘテロ変異(+/-)マウスのテール DNA のサザンブロット分析を示す写真である。プローブ A により同定された、11.8kb 野生型および 8.2kb 標的対立遺伝子の EcoRI-EcoRI 断片が示されている。また、図 2 B は、CXCR4 発現の RT-PCR 増幅分析を示す写真である。全 RNA は E18.5 の野生型およびホモ変異胚から調製し、さらに CXCR4 特異的プライマーで増幅した。RT-PCR 増幅はまた、増幅可能な RNA の存在のコントロールとして、普遍的に発現している G3PDH mRNA を用いた。

CXCR4 ヘテロ (+/-) 変異を有するマウスを作製した。該マウスは健康でかつ妊娠可能であった。CXCR4 ホモ (-/-) 変異胚は胚形成の E15.5 まで予想された比で存在した。しかし、既に報告している PBSF/SDF-1 欠損マウスと同様に (Nagasawa, T. et al. Nature 382, 685-688 (1996))、約半分の CXCR4-/-胚は E18.5 で死亡し、CXCR4-/-新生仔は 1 時間以内に死亡した。

胚形成時において、CXCR4 の機能を明らかにするために、CXCR4 の成育中の胚における発現を *in situ* ハイブリダイゼーションにより調べた。CXCR4 転写物が、胚形成時において血管形成時の内皮に高いレベルで検出された。

この知見に基づき、血管形成における CXCR4 遺伝子欠損の効果を調べた。卵黄および臍帯の血管は視覚的には正常であった。E18.5 の CXCR4-/-胚の組織学的検査では、主な血管である大動脈、大静脈、頸動脈、頸静脈、腹腔動脈、腸間膜動脈および腸間膜静脈の存在が認められた。その後、器官の血管系を可視化するた

め、野生型及び変異胚の全組織調製物について、抗 PECAM-1 抗体で免疫染色した。PECAM-1 は胎生期を通じて、すべての内皮細胞において特異的かつ安定に発現することが知られている (Vecchi, A. et al. Eur.J. Cell Biol. 63, 247-255(1994)、Baldwin, H. S. et al.. Development 120, 2539-2558 (1994))。

- 5 その結果、E11.5 までは胃、小腸、および腸間膜を含む胃腸組織において、高度に分岐した均一な血管系が野生型と変異型ともに認められた。E12.5 付近では、中腸ループに結合している腸間膜において大小の血管が再構成により形成されていることが認められた。E13.5 での野生型胚では図 3 に示されるように、腸管へ栄養する腸間膜動脈や腸間膜静脈から分岐する多くの大分枝が形成されていた。
- 10 一方、E13.5 での CXCR4^{-/-}胚の腸間膜では、これらの大分枝が存在せず、その代わりより小さな血管のみが生じていた。顕微鏡を用いた組織学的分析によれば、E13.5 での野生型胚の腸間膜には腸間膜動脈や腸間膜静脈が認められ、これより分岐した血管は動脈、静脈が対となっていた(図 4)。これとは対照的に、CXCR4^{-/-}胚の大部分の血管は図 8 に見られるように対ではなく一本であった。ただし、変異胚の腸間膜内の腸間膜動脈や腸間膜静脈は正常であった。E17.5 での野生型胚では、腸間膜の大型の血管は多くの分枝を出し腸管に達していた(図 5 と図 6)。
- 15 しかしながら、CXCR4^{-/-}胚ではこのような腸間膜の大型の血管に相当する血管は実質的に欠損していた(図 9 と図 6)。また、変異腸間膜では異常な分岐を示す大型の血管が認められた(図 9 と図 6)。このような血管系の欠損により、大部分の E16.5 の変異胚の小腸には多数の出血様病変が見られた。この病変は腸を支配する循環系の異常によるものと考えられる(図 11)。
- 20 以上の結果から、CXCR4 は、小腸の正常な血管形成に必須であることが示された。その作用機序としては CXCR4 は、腸間膜の血管の分岐及び／又は再構成に関与していると考えられる。

- 25 胃の場合、野生型胚では、E13.5 までに、小弯側の間葉から分岐する大型の血管が形成され、腹側および背側表面全体に分布している(図 12 A、12 C)。組

組織学的解析によると、この血管は E15.5 の野生型マウスにおいて、図 1 2 C 内に挿入した写真で示されるように、静脈と動脈が対をなしていた。しかしながら、これに相当する血管は変異胚には認められなかった (図 1 2 B、1 2 D)。胃を取り巻く小血管ネットワークの形成は、変異胚でも正常に見えた (図 1 2 D)。

5 E18.5 での変異胚の胃腸の組織学的分析では、器官形成に何等異常は認められなかった。例えば、変異マウスの胃、腸管の平滑筋層は、外層および内層それぞれ、縦方向および垂直方向に正常に認められた。

図 3 ~ 6 は、CXCR4^{-/-}胚における胃腸系血管欠損を示す写真であり、野生型の腸間膜および腸の、抗 PECAM-1 抗体による免疫染色を示す写真である。図 3 は
10 E13.5 での腸間膜と中腸ループ領域を示す。図 5 は E17.5 での空腸を示す。図 6 は E17.5 での空腸を示す。図 7 は E13.5 での染色した腸間膜の断面を示す。図 3, 5, 6 での矢印は、野生型腸間膜の小腸を栄養する上腸間膜動脈又は静脈よりの大型の分枝を示す。

また、図 7 ~ 1 1 は、同様に CXCR4^{-/-}胚における胃腸系血管欠損を示す写真
15 であり、変異型の腸間膜および腸の、抗 PECAM-1 抗体による免疫染色を示す写真である。図 7 は E13.5 での腸間膜と中腸ループ領域を示す。図 9 は E17.5 での空腸を示す。図 1 0 は E17.5 での空腸を示す。図 8 は E13.5 での染色した腸間膜の断面を示す。図 1 1 は E16.5 での変異マウスの未染色の腸出血様病変を示す。図 9, 1 0 での矢印は、変異マウスの走行、分岐が異常な大型の血管を示す。

20 また、図 1 2 A から 1 2 D は、抗 PECAM-1 抗体による胃の免疫染色の結果を示す写真である。図 1 2 A と 1 2 B が E13.5、図 1 2 C と 1 2 D は E15.5、図 1 2 A と 1 2 C は野生型、図 1 2 B と 1 2 D は変異型を示す。図 1 2 C の写真内に挿入された写真は、E15.5 での染色した胃の壁内の大型の血管のヘマトキシリン-
エオジン染色された断面を示す。図 1 2 A と 1 2 C の矢印は野生型にのみ観察される大型の血管を示す。du は十二指腸、p は中間腸ループの近位を、dm は中間腸ループの末梢部、a は動脈、v は静脈を示す。
25

これらの知見は、CXCR4^{-/-}マウスにおける血管形成の異常は、消化管そのものの異常による二次的なものではないことを示している。このような血管形成の異常と同様の異常が PBSF/SDF-1 欠損マウスでも認められた。

in situ ハイブリダイゼーション分析によれば、E12.5 の野生型胚の腸間膜、
5 腸壁及び胃壁の血管内皮細胞に CXCR4 転写物が発現していることが示された(図 1 3 B と 1 3 E)。特に、腸間膜動脈の分枝の内皮細胞に強い発現が観察された(図 1 3 B、1 3 E)。これとは対照的に、PBSF/SDF-1 は腸間膜の内皮細胞をとりまく間葉細胞において高いレベルで発現していたが、腸と胃の壁や内皮細胞には発現していなかった(図 1 3 C)。

10 図 1 3 A から 1 3 F は in situ ハイブリダイゼーションによる胃腸組織での CXCR4 および PBSF/SDF-1 の発現の解析を示す写真である。野生型の中腸ループにつながる腸間膜の連続切片を用いて、1 枚はヘマトキシリン-エオジンで染色し(図 1 3 A と 1 3 D)、もう 1 枚は CXCR4 特異的プローブとハイブリダイズし(図 1 3 B と 1 3 E)、更にもう 1 枚は PBSF/SDF-1 特異的プローブとハイブリダイズした(図 1 3 E)。図 1 3 D と 1 3 E は、図 1 3 A と 1 3 B の上腸間膜動脈から生じた分岐血管の拡大図であり、血管内皮細胞に CXCR4 の強い発現があることが示された。図 1 3 B と 1 3 E の矢印矢頭は、腸間膜血管の CXCR4 の発現が認められる内皮細胞を示す。腸間膜内の内皮細胞を取り巻く間葉細胞で PBSF/SDF-1 が発現している(図 1 3 E)。野生型 E18.5 胚の骨髓の断面であり、造血細胞内で CXCR4
15 が発現し、紡錘型のストローマ細胞で発現していない(図 1 3 F)。m は、腸間膜、i は、小腸、a は上腸間膜動脈、v は上腸間静脈を示す。

得られた発現パターンは、間葉細胞により産生された PBSF/SDF-1 が内皮細胞上の CXCR4 に作用することを示し、これより腸間膜の間葉において極めて重要な役割を果たすサイトカインによるパラクラインシグナルの存在が強く示唆される。

25 このことから CXCR4^{-/-}および PBSF/SDF-1^{-/-}の胃で大血管を欠損する表現型も、胃の小弯に沿う間葉での血管の分岐または再構成の異常による結果である可能性

がある。

他の器官で血管系を調べるため、卵黄嚢、脳、心臓を抗 PECAM-1 モノクローナル抗体で染色した。卵黄嚢(E12.5,E14.5)、頭領域(E11.5)、心臓(E12.5-E14.5)の大および小血管の形成は、CXCR4^{-/-}、PBSF/SDF-1^{-/-}と、野生型の間で明らかな差はなかった。

5 以上の実験結果をまとめると、CXCR4 と PBSF/SDF-1 は血管内皮細胞に作用して血管分岐又は再構成を制御することにより、胃腸組織へ供給する成熟血管系の形成に必須であることが示された。

10 フローサイトメトリー分析によると、CXCR4^{-/-}マウスの胎仔肝臓のB細胞前駆細胞が極めて減少していることが明らかとなった。組織学的分析では、骨髓腔の骨髓球系細胞およびその前駆細胞が認められなかった。さらに、E18.5 の変異マウスの心臓では心室中隔の膜性部の欠損が見いだされた。これらの異常は PBSF/SDF-1 欠損マウスで観察された表現型と非常に似ており、CXCR4 が、PBSF/SDF-1 の主要な生理的受容体であるという考えを支持する。

15 *in situ* ハイブリダイゼーションにより E18.5 での野生型マウスの骨髓においては、造血細胞において CXCR4 転写物が発現していたが PBSF/SDF-1 転写物の発現が認められた紡錘型ストローマ細胞には CXCR4 転写物が発現されなかった(図 (Fig3d))。これらの発現パターンの結果は、骨髓においてパラクラインシグナルの存在を意味するものである。

20 今まで報告された Flk-1、Tie-2 などの受容体チロシンキナーゼ(RTKs)と、VEGF、アンジオポイエチン-1、PDGF-B のようなそのリガンドの変異マウスを用いた解析によれば、それらは血管系の発育に重要な役割を果たし、それらの多くは、発生における血管形成のごく初期過程及び体のいたるところでの血管形成(卵黄嚢、必要、胚外の脈管構造を含む)に必要であることが知られている(Shalaby, F. et al. Nature 376, 62-66 (1995)、Fong, G.-H., Rossant, J., Gertsenstein, M. & Breitman, M. L. Nature 376, 66-70 (1995)、Dumont, D.J. et al. GenesDev.

25

8, 1897-1909 (1994)、Sato, T. N. et al. Nature 376, 70-74 (1995)、Carmeliet, P. et al. Nature 880, 435-439 (1996)、Ferrara, N. et al. Nature 380, 439-442 (1996)、Suri, C. et al. Cell 87, 1171-1180 (1996))。

5 これとは対照的に、CXCR4 および PBSF/SDF-1 の作用は発生においてより後期であり、器官特異的である。Tie-2 およびそのリガンドであるアンジオポイエチン-1 は、初期の血管系で分岐および／または再構成に必要と考えられている (Sato, T. N. et al. Nature 376, 70-74 (1995)、Suri, C. et al. Cell 87, 1171-1180 (1996))。消化管での成熟血管系形成における役割は明らかでない。また、Tie-2 又はアンジオポイエチン-/-マウスで観察される卵黄囊血管系における明確な異常は、CXCR4 または PBSF/SDF-1-/-マウスでは認められなかった。10 一方、PF4(Maione, T. E. et al. Science 247, 77-79 (1990))、IL-8(Koch, A. E. et al. Science 258, 1798-1801 (1992))、IP-10(Luster, A. D. et al., J. Exp. Med. 182, 219-231 (1995))、および Gro β (Cao, Y. H., et al., J. J. Exp. Med. 182, 2069-2077 (1995))といった CXC ケモカインも血管新生制御因子であることが報告されている。しかし、内皮細胞でのレセプターの発現や生理学的役割はいまだ解明されていない。凝固因子 V(Cui, J., et al. Nature 384, 66-68 (1996)) 及び組織因子(Carmeliet, P. et al. Nature 883, 78-75 (1996))は、卵黄囊血管系 に必須であることが示されているが、これらの因子がいかなる受容体を介して作用するかは明らかでない。

20 以上の背景から、本発明はケモカインと 7 回膜貫通 G タンパク質共役型受容体という血管形成に必須の新規なシグナル系の存在を示したと言える。

最近、ヘテロ三量体 GTP 結合タンパク質 G α 13 の α サブユニットを欠損するマウスでは、卵黄囊の血管系が形成されないこと及び胚体の小血管が拡大するなどの異常があることが示された。その表現型は CXCR4 欠損マウスとは異なるが、25 CXCR4 が G α 13 と共役する可能性について検討する必要がある。

CXCR4 と CCR5 は、それぞれ T 細胞系親和性およびマクロファージ親和性の HIV-1

株が宿主細胞に感染するのに必須のコレセプターであることが知られている (Feng, Y., et al., Science 272, 872-877 (1996)、Fauci, A. S. Nature 384, 529-584 (1996))。このうち CCR5 を欠損したホモ変異体の人々が見出されており、これらの人々は、HIV-1 感染に抵抗性であり何ら健康に問題はない(Liu, R et al. Cell 86, 367-377 (1996)、Samson, M. et al. Nature 382, 722-725(1996)、Dean, M. et al. Science 273, 1856-1861)。

しかし、もう一方の CXCR4 に関しては、CXCR4 欠損マウスが胚時期に致死性であることから、ヒトでの CXCR4 ホモ欠損はありえないことが強く示唆された。ただし、T細胞系親和性 HIV-1 抵抗性の長期生存者においては他の遺伝的要因または生存可能な CXCR4 ホモ変異が存在する可能性は残されている。

産業上の利用可能性

CXCR4 ノックアウトマウスにおいては血管の形成が抑制されたという本発明による知見に基づき、CXCR4 の作用を阻害する物質を有効成分として含有する血管形成抑制剤、また癌組織の維持、拡大において血管形成は必須であることから、抗固形癌剤の作成、及び CXCR4 の作用を阻害する物質を有効成分として含有する血管新生を病態形成要因とする疾患の治療剤の作成、さらには、CXCR4 の作用を増強する物質を有効成分として含有する組織修復剤の作成に用いることができる。

請求の範囲

1. CXCR4 に基づく作用を阻害する物質を有効成分として含有してなる血管形成を抑制する治療剤。

5 2. CXCR4 に基づく作用を阻害する物質を有効成分として含有してなる固形癌に対する治療剤。

3. CXCR4 に基づく作用を阻害する物質を有効成分として含有してなる血新生を病態形成要因とする疾患の治療剤。

4. CXCR4 に基づく作用を阻害する有効成分として含有してなる組織を修復する治療剤。

10 5. 前記物質が、SDF-1 と CXCR4 との結合自体を阻害することを特徴とする請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の治療剤。

6. 前記物質が CXCR4 から核へのシグナル伝達を阻害することを特徴とする請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の治療剤。

15 7. 前記物質が CXCR4 自体の発現を阻害することを特徴とする請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の治療剤。

8. 前記物質が SDF-1 自体の発現を阻害することを特徴とする請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の治療剤。

9. 請求項 5 のおいてさらに、前記物質が、SDF-1 を阻害することを特徴とする治療剤。

20 10. 請求項 5 においてさらに、前記物質が、CXCR4 を阻害することを特徴とする治療剤。

11. 請求項 9 においてさらに、前記物質が、CXCR4 に対し SDF-1 と拮抗的に競合し阻害することを特徴とする治療剤。

25 12. 請求項 9 においてさらに、前記物質が、SDF-1 に結合して CXCR4 への SDF-1 の結合を阻害することを特徴とする治療剤。

13. 請求項 11 においてさらに、前記物質が、SDF-1 類似蛋白質、

前記蛋白質と他のペプチド又はポリペプチドとの融合蛋白質、SDF-1 の部分ペプチド、又は SDF-1 の結合部位と類似の構造を有する低分子化合物からなる群から選ばれる 1 つであることを特徴とする治療剤。

14. 請求項 12 においてさらに、前記物質が、抗 SDF-1 抗体、抗 SDF-1 抗体活性を有する前記抗体断片、SDF-1 に対する結合活性を有する融合タンパク質、SDF-1 の構造変化を誘導する物質、及び SDF-1 の CXCR4 との結合部位に結合可能な低分子化合物からなる群から選ばれる 1 つであることを特徴とする治療剤。

15. 請求項 10 においてさらに、前記物質が、SDF-1 との結合において CXCR4 と拮抗的に競合して阻害することを特徴とする治療剤。

16. 請求項 10 においてさらに、前記物質が、CXCR4 に結合して SDF-1 の CXCR4 への結合を阻害することを特徴とする治療剤。

17. 請求項 15 においてさらに、前記物質が、CXCR4 と拮抗的に阻害する可溶性 CXCR4、CXCR4 と類似の構造を有するタンパク質、前記タンパク質と他のペプチド又はポリペプチドとの融合タンパク質、及び CXCR4 部分ペプチド及び CXCR4 の結合部位と類似の構造を有する低分子化合物からなる群から選ばれる 1 つであることを特徴とする治療剤。

18. 請求項 16 においてさらに、前記物質が、抗 CXCR4 抗体、抗 CXCR4 抗体活性を有する抗体断片、CXCR4 に対する結合活性を有する融合タンパク質、SDF-1 の構造変化を誘導する物質および CXCR4 の SDF-1 結合部位に結合する低分子化合物からなる群から選ばれる 1 つであることを特徴とする治療剤。

19. 請求項 6 においてさらに、前記物質が G タンパク共役タンパク質の下流に存在するシグナル伝達系の阻害剤であって、MAPK カスケード阻害剤、ホスホライペース C (PLC) の阻害剤、及び PI3 キナーゼ基ナーゼ阻害剤からなる群から選ばれる 1 つであることを特徴とする治療剤。

20. 請求項 7 においてさらに、前記物質が、細胞上からみかけ上 CXCR4 を消失させる物質であって、細胞膜に作用して細胞膜の流動性を変化させ、細胞

膜上から CXCR4 を消失させることを特徴とする治療剤。

5 21. 請求項7においてさらに、前記物質が、CXCR4 自体の発現を阻害する物質であって、アンチジーン、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アンチセンスベクターにより発現されるアンチセンスRNA、リボザイム及びCXCR4 発現調節部位に対する阻害性物質からなる群から選ばれる1つであることを特徴とする治療剤。

 22. 請求項8においてさらに、前記物質が SDF-1 の発現阻害のためのアンチセンスであることを特徴とする治療剤。

10 23. 請求項8においてさらに、前記物質が SDF-1 の発現調節部位に対し阻害することを特徴とする治療剤。

 24. CXCR4 に基づく作用を阻害する物質を用いる血管形成抑制方法。

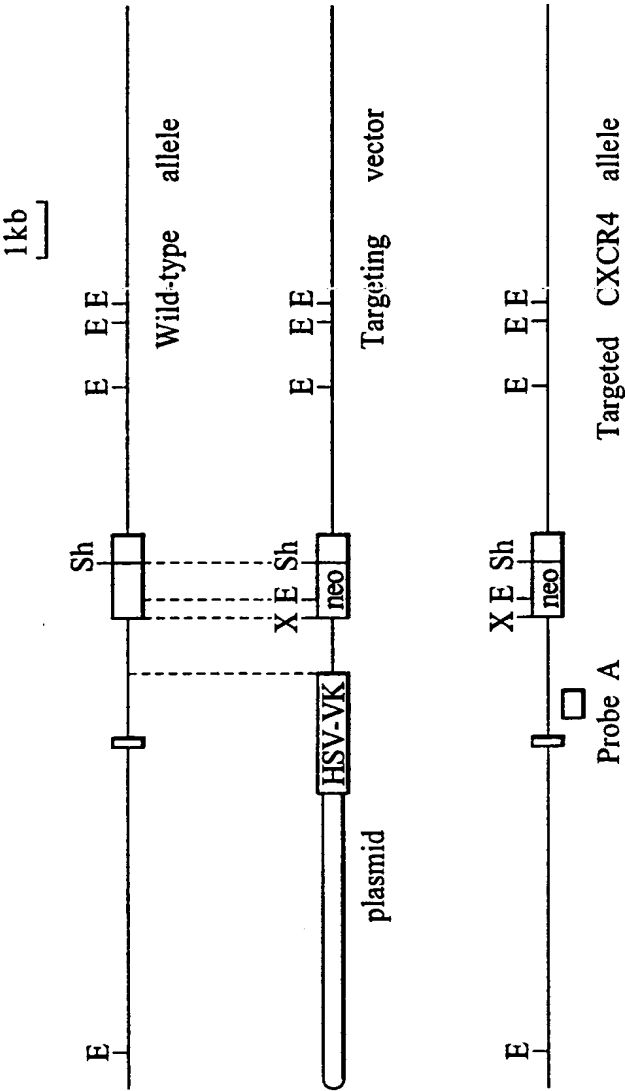
 25. CXCR4 に基づく作用を阻害する物質を用いる固形癌治療方法。

 26. CXCR4 に基づく作用を阻害する物質を用いる血新生を病態形成要因とする疾患の治療方法。

15 27. CXCR4 に基づく作用を阻害する物質を用いる組織修復方法。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

図1



THIS PAGE BLANK (USPTO)

図2A

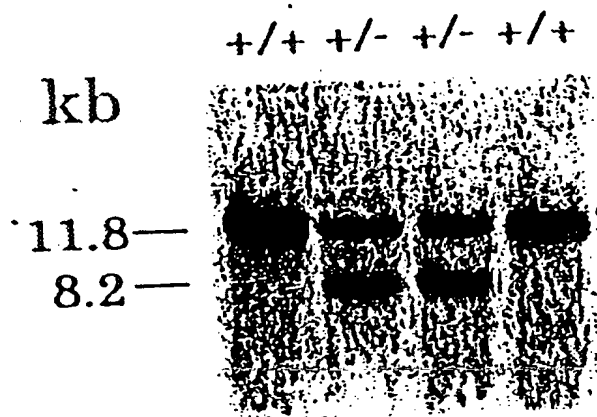
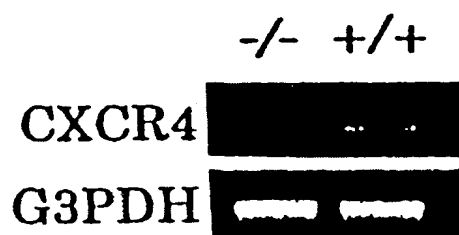


図2B



THIS PAGE BLANK (USPTO)

図3

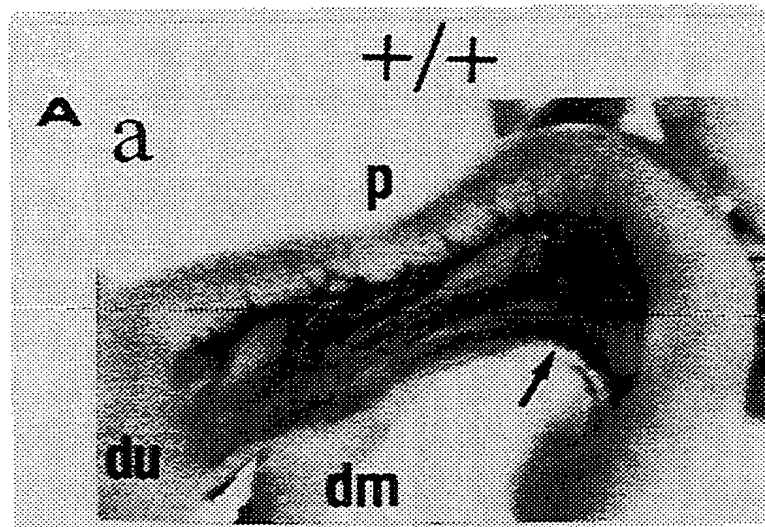
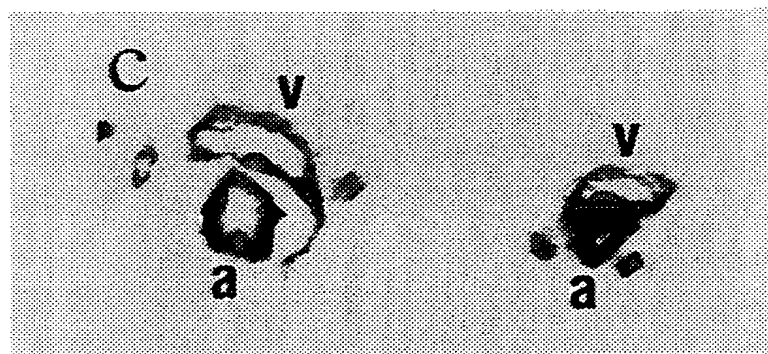


図4



THIS PAGE BLANK (USPTO,

図5



図6



THIS PAGE BLANK (USPTO)

図7

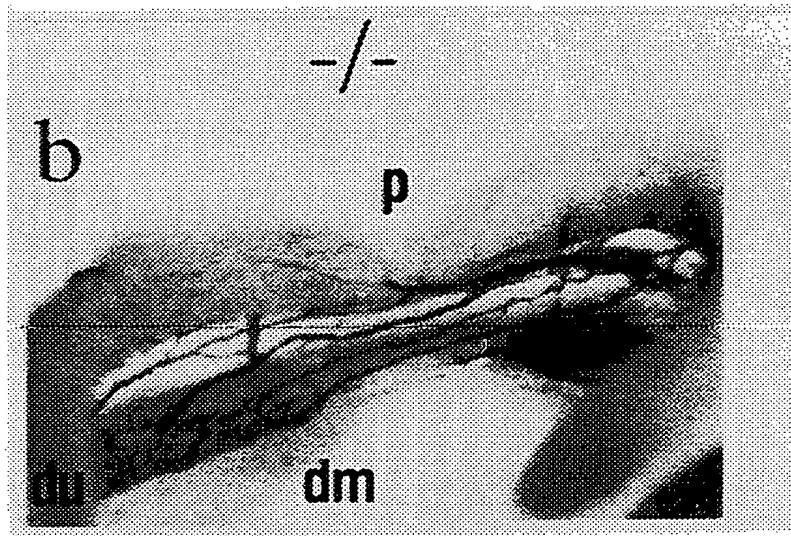
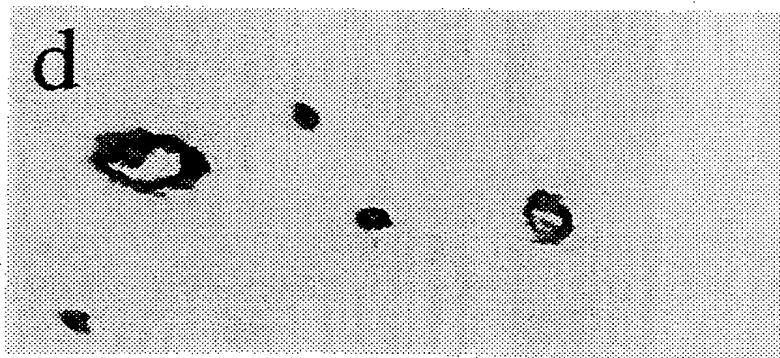


図8



THIS PAGE BLANK (USPTO,

図9



図10

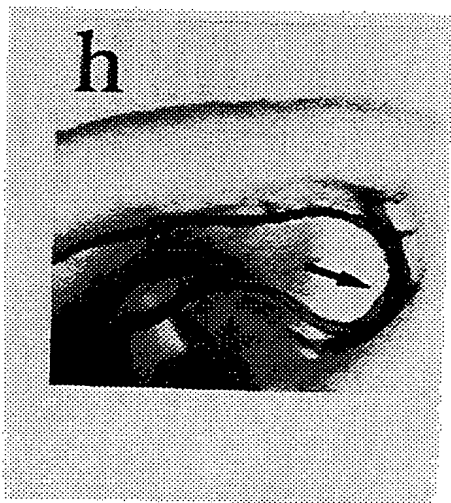
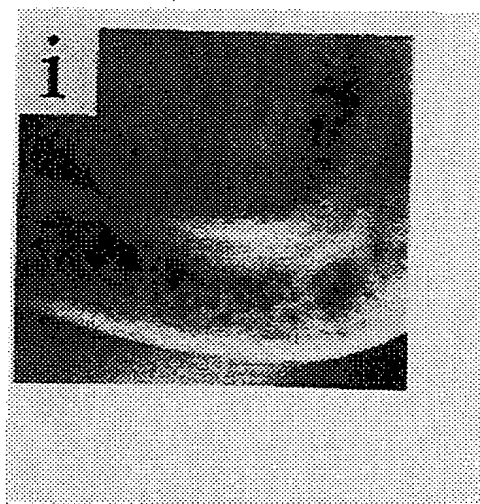


図11



THIS PAGE BLANK (USPTO)

図12A



図12B



THIS PAGE BLANK (USPTO)

図12C

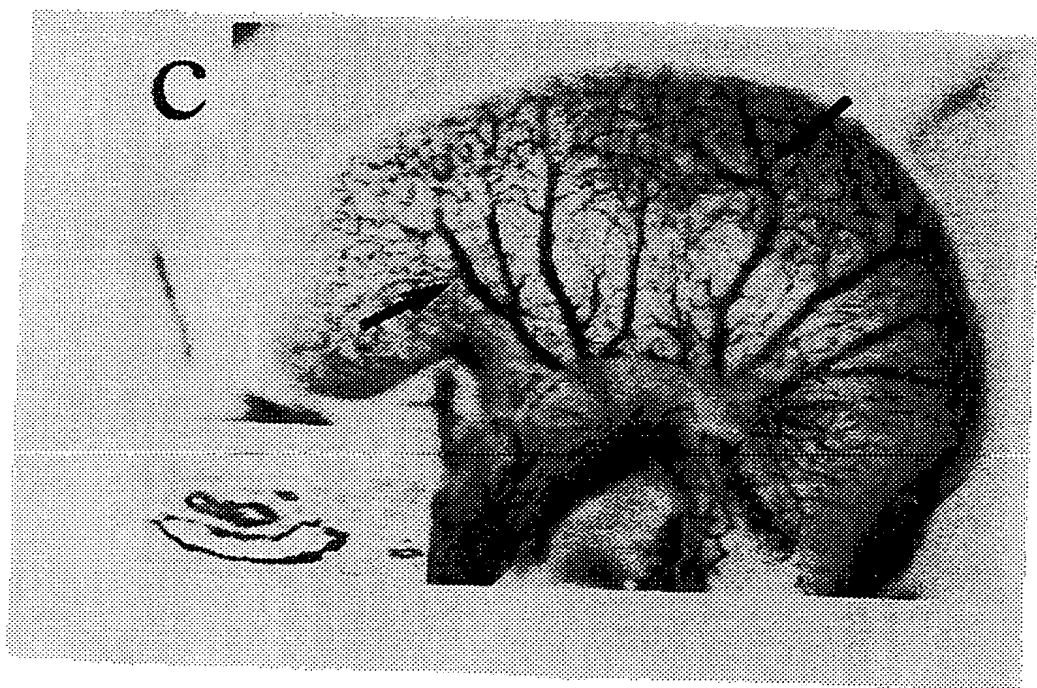


図12D



THIS PAGE BLANK (USPTO)

図13A

図13B

図13C

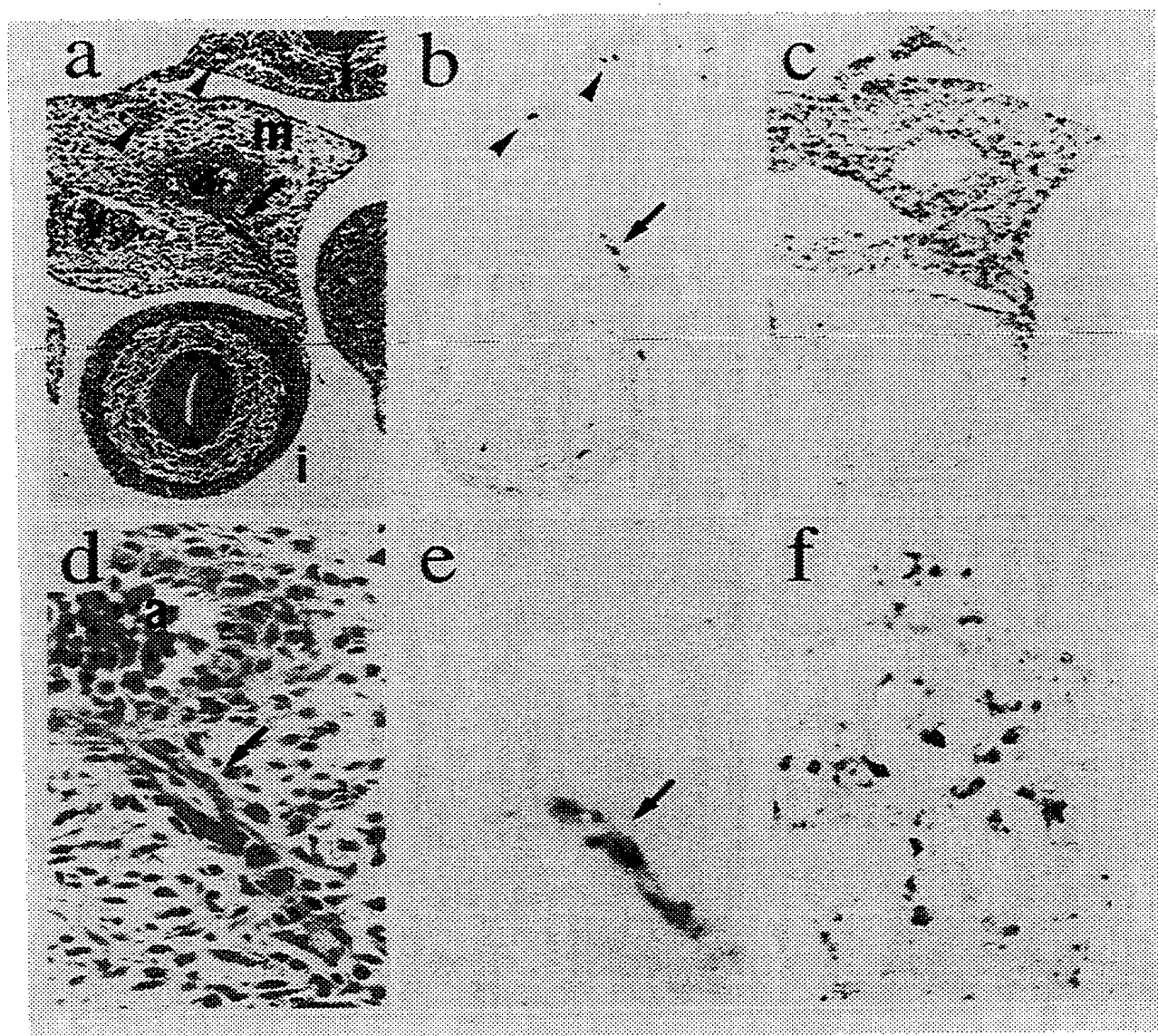


図13D

図13E

図13F

THIS PAGE BLANK (USPTO)

配列表
SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSIKI KAISHA

5

<120>Angiogenesis

<130>CGS 98-06 PCT

10

<160> 12

<210>1

<211>352

<212>PRT

15

<213>Mus

<400>1

	Met Glu Gly Ile Ser Ile Tyr Thr Ser Asp Asn Tyr Thr Glu Glu	
	5 10	15
20	Met Gly Ser Gly Asp Tyr Asp Ser Met Lys Glu Pro Cys Phe Arg	
	20 25	30
	Glu Glu Asn Ala Asn Phe Asn Lys Ile Phe Leu Pro Thr Ile Tyr	
	35 40	45
	Ser Ile Ile Phe Leu Thr Gly Ile Val Gly Asn Gly Leu Val Ile	
25	50 55	60
	Leu Val Met Gly Tyr Gln Lys Lys Leu Arg Ser Met Thr Asp Lys	
	65 70	75
	Tyr Arg Leu His Leu Ser Val Ala Asp Leu Leu Phe Val Ile Thr	
	80 85	90
30	Leu Pro Phe Trp Ala Val Asp Ala Val Ala Asn Trp Tyr Phe Gly	
	95 100	105
	Asn Phe Leu Cys Lys Ala Val His Val Ile Tyr Thr Val Asn Leu	
	110 115	120
	Tyr Ser Ser Val Leu Ile Leu Ala Phe Ile Ser Leu Asp Arg Tyr	
35	125 130	135
	Leu Ala Ile Val His Ala Thr Asn Ser Gln Arg Pro Arg Lys Leu	
	140 145	150
	Leu Ala Glu Lys Val Val Tyr Val Gly Val Trp Ile Pro Ala Leu	
	155 160	165
40	Leu Leu Thr Ile Pro Asp Phe Ile Phe Ala Asn Val Ser Glu Ala	
	170 175	180
	Asp Asp Arg Tyr Ile Cys Asp Arg Phe Tyr Pro Asn Asp Leu Trp	
	185 190	195
	Val Val Val Phe Gln Phe Gln His Ile Met Val Gly Leu Ile Leu	
45	200 205	210

THIS PAGE BLANK (cont.)

	Pro Gly Ile Val Ile Leu Ser Cys Tyr Cys Ile Ile Ile Ser Lys	
	215	220
	Leu Ser His Ser Lys Gly His Gln Lys Arg Lys Ala Leu Lys Thr	225
	230	235
5	Thr Val Ile Leu Ile Leu Ala Phe Phe Ala Cys Trp Leu Pro Tyr	240
	245	250
	Tyr Ile Gly Ile Ser Ile Asp Ser Phe Ile Leu Leu Glu Ile Ile	255
	260	265
	Lys Gln Gly Cys Glu Phe Glu Asn Thr Val His Lys Trp Ile Ser	270
10	275	280
	Ile Thr Glu Ala Leu Ala Phe Phe His Cys Cys Leu Asn Pro Ile	285
	290	295
	Leu Tyr Ala Phe Leu Gly Ala Lys Phe Lys Thr Ser Ala Gln His	300
	305	310
15	Ala Leu Thr Ser Val Ser Arg Gly Ser Ser Leu Lys Ile Leu Ser	315
	320	325
	Lys Gly Lys Arg Gly Gly His Ser Ser Val Ser Thr Glu Ser Glu	330
	335	340
	Ser Ser Ser Phe His Ser Ser	345
20	350	

<210>2

<211>1588

<212>DNA

25 <213>Mus

<220>

<221>CDS

<222>(1)...(1059)

30

<400>2

	atg gag ggg atc agt ata tac act tca gat aac tac acc gag gaa	45
	atg ggc tca ggg gac tat gac tcc atg aag gaa ccc tgt ttc cgt	90
	gaa gaa aat gct aat ttc aat aaa atc ttc ctg ccc acc atc tac	135
35	tcc atc atc ttc tta act ggc att gtg ggc aat gga ttg gtc atc	180
	ctg gtc atg ggt tac cag aag aaa ctg agā agc atg acg gac aag	225
	tac agg ctg cac ctg tca gtg gcc gac ctc ctc ttt gtc atc acg	270
	ctt ccc ttc tgg gca gtt gat gcc gtg gca aac tgg tac ttt ggg	315
	aac ttc cta tgc aag gca gtc cat gtc atc tac aca gtc aac ctc	360
40	tac agc agt gtc ctc atc ctg gcc ttc atc agt ctg gac cgc tac	405
	ctg gcc atc gtc cac gcc acc aac agt cag agg cca agg aag ctg	450
	ttg gct gaa aag gtg gtc tat gtt ggc gtc tgg atc cct gcc ctc	495
	ctg ctg act att ccc gac ttc atc ttt gcc aac gtc agt gag gca	540
	gat gac aga tat atc tgt gac cgc ttc tac ccc aat gac ttg tgg	585
45	gtg gtt gtg ttc cag ttt cag cac atc atg gtt ggc ctt atc ctg	630

THIS PAGE BLANK (USPTO

cct ggt att gtc atc ctg tcc tgc tat tgc att atc atc tcc aag 675
 ctg tca cac tcc aag ggc cac cag aag cgc aag gcc ctc aag acc 720
 aca gtc atc ctc atc ctg gct ttc ttc gcc tgt tgg ctg cct tac 765
 tac att ggg atc agc atc gac tcc ttc atc ctc ctg gaa atc atc 810
 5 aag caa ggg tgt gag ttt gag aac act gtg cac aag tgg att tcc 855
 atc acc gag gcc cta gct ttc ttc cac tgt tgt ctg aac ccc atc 900
 ctc tat gct ttc ctt gga gcc aaa ttt aaa acc tct gcc cag cac 945
 gca ctc acc tct gtg agc aga ggg tcc agc ctc aag atc ctc tcc 990
 aaa gga aag cga ggt gga cat tca tct gtt tcc act gag tct gag 1035
 10 tct tca agt ttt cac tcc agc taa cacagatgta aaagactttt ttttat 1085
 acgataaata actttttttt aagttacaca tttttcagat ataaaagact gaccaatatt 1145
 gtacagtttt tattgcttgt tggatttttg tcttggtttt ctttagtttt tgtgaagttt 1205
 aattgactta tttatataaaa ttttttttgt ttcattatga tgtgtgtcta ggcaggacct 1265
 gtggccaagt tcttagttgc tgtatgtctc gtggtaggac tgtagaaaag ggaactgaac 1325
 15 attccagagc gtgtagttaa tcacgtaaag ctagaaatga tccccagctg tttatgcata 1385
 gataatctct ccattcccgt ggaacgtttt tctgttctt aagacgtgat tttgtgttag 1445
 aagatggcac ttataaccaa agcccaaagt ggtatagaaa tgctggtttt tcagttttca 1505
 ggagtgggtt gatttcagca cctacagtgt acagtcttgt attaagttgt taataaaagt 1565
 acatgttaaa cttaaaaaaa aaa 1588
 20
 <210>3
 <211>359
 <212>PRT
 <213>Mus
 25
 <400>3
 Met Glu Pro Ile Ser Val Ser Ile Tyr Thr Ser Asp Asn Tyr Ser
 5 10 15
 Glu Glu Val Gly Ser Gly Asp Tyr Asp Ser Asn Lys Glu Pro Cys
 20 25 30
 Phe Arg Asp Glu Asn Val His Phe Asn Arg Ile Phe Leu Pro Thr
 35 40 45
 Ile Tyr Phe Ile Ile Phe Leu Thr Gly Ile Val Gly Asn Gly Leu
 50 55 60
 35 Val Ile Leu Val Met Gly Tyr Gln Lys Lys Leu Arg Ser Met Thr
 65 70 75
 Asp Lys Tyr Arg Leu His Leu Ser Val Ala Asp Leu Leu Phe Val
 80 85 90
 Ile Thr Leu Pro Phe Trp Ala Val Asp Ala Met al.a Asp Trp Tyr
 95 100 105
 40 Phe Gly Lys Phe Leu Cys Lys Ala Val His Ile Ile Tyr Thr Val
 110 115 120
 Asn Leu Tyr Ser Ser Val Leu Ile Leu Ala Phe Ile Ser Leu Asp
 125 130 135
 45 Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Thr Asn Ser Gln Arg Pro Arg

THIS PAGE BLANK (USPTO)

	140	145	150
	Lys Leu Leu Ala Glu Lys Ala Val Tyr Val Gly Val Trp Ile Pro		
	155	160	165
	Ala Leu Leu Leu Thr Ile Pro Asp Phe Ile Phe Ala Asp Val Ser		
5	170	175	180
	Gln Gly Asp Ile Ser Gln Gly Asp Asp Arg Tyr Ile Cys Asp Arg		
	185	190	195
	Leu Tyr Pro Asp Ser Leu Trp Met Val Val Phe Gln Phe Gln His		
	200	205	210
10	Ile Met Val Gly Leu Ile Leu Pro Gly Ile Val Ile Leu Ser Cys		
	215	220	225
	Tyr Cys Ile Ile Ile Ser Lys Leu Ser His Ser Lys Gly His Gln		
	230	235	240
	Lys Arg Lys Ala Leu Lys Thr Thr Val Ile Leu Ile Leu Ala Phe		
15	245	250	255
	Phe Ala Cys Trp Leu Pro Tyr Tyr Val Gly Ile Ser Ile Asp Ser		
	260	265	270
	Phe Ile Leu Leu Gly Val Ile Lys Gln Gly Cys Asp Phe Glu Ser		
	275	280	285
20	Ile Val His Lys Trp Ile Ser Ile Thr Glu Ala Leu Ala Phe Phe		
	290	295	300
	His Cys Cys Leu Asn Pro Ile Leu Tyr Ala Phe Leu Gly Ala Lys		
	305	310	315
	Phe Lys Ser Ser Ala Gln His Ala Leu Asn Ser Met Ser Arg Gly		
25	320	325	330
	Ser Ser Leu Lys Ile Leu Ser Lys Gly Lys Arg Gly Gly His Ser		
	335	340	345
	Ser Val Ser Thr Glu Ser Glu Ser Ser Ser Phe His Ser Ser		
	350	355	
30			
	<210>4		
	<211>1758		
	<212>DNA		
	<213>Mus		
35			
	<220>		
	<221>CDS		
	<222>(1)...(1080)		
	<223>		
40			
	<400>4		
	atg gaa ccg atc agt gtg agt ata tac act tct gat aac tac tct 45		
	gaa gaa gtg ggg tct gga gac tat gac tcc aac aag gaa ccc tgc 90		
	ttc cgg gat gaa aac gtc cat ttc aat agg atc ttc ctg ccc acc 135		
45	atc tac ttc atc atc ttc ttg act ggc ata gtc ggc aat gga ttg 180		

THIS PAGE BLANK (USF)

gtg atc ctg gtc atg ggt tac cag aag aag cta agg agc atg acg 225
 gac aag tac cgg ctg cac ctg tca gtg gct gac ctc ctc ttt gtc 270
 atc aca ctc ccc ttc tgg gca gtt gat gcc atg gct gac tgg tac 315
 ttt ggg aaa ttt ttg tgt aag gct gtc cat atc atc tac act gtc 360
 5 aac ctc tac agc agc gtt ctc atc ctg gcc ttc atc agc ctg gac 405
 cgg tac ctc gcc att gtc cac gcc acc aac agt caa agg cca agg 450
 aaa ctg ctg gct gaa aag gca gtc tat gtg ggc gtc tgg atc cca 495
 gcc ctc ctc ctg act ata cct gac ttc atc ttt gcc gac gtc agc 540
 cag ggg gac atc agt cag ggg gat gac agg tac atc tgt gac cgc 585
 10 ctt tac ccc gat agc ctg tgg atg gtg gtg ttt caa ttc cag cat 630
 ata atg gtg ggt ctc atc ctg ccc ggc atc gtc atc ctc tcc tgt 675
 tac tgc atc atc atc tct aag ctg tca cac tcc aag ggc cac cag 720
 aag cgc aag gcc ctc aag acg aca gtc atc ctc atc cta gct ttc 765
 ttt gcc tgc tgg ctg cca tat tat gtg ggg atc agc atc gac tcc 810
 15 ttc atc ctt ttg gga gtc atc aag caa gga tgt gac ttc gag agc 855
 att gtg cac aag tgg atc tcc atc aca gag gcc ctc gcc ttc ttc 900
 cac tgt tgc ctg aac ccc atc ctc tat gcc ttc ctc ggg gcc aag 945
 ttc aaa agc tct gcc cag cat gca ctc aac tcc atg agc aga ggc 990
 tcc agc ctc aag atc ctt tcc aaa gga aag cgg ggt gga cac tct 1035
 20 tcc gtc tcc acg gag tca gaa tcc tcc agt ttt cac tcc agc taa 1080
 cccttatgca aagacttata taatatatat atatatatga taaagaactt ttttatgtta 1140
 cacattttcc agatataaga gactgaccag tctgtacag ttttttttt tttttaattg 1200
 actgttgga gtttatgttc ctctagtttt tgtgagggtt gacttaattt atataaatat 1260
 tgttttttgt ttgtttcatg tgaatgagcg tctaggcagg acctgtggcc aagttcttag 1320
 25 tagctgttta tctgtgtgta ggactgtaga actgtagagg aagaaactga acattccaga 1380
 atgtgtgta aattgaataa agctagccgt gatcctcagc tgttctgca taatctcttc 1440
 attccgagga gcacccacc cccaccccca ccccccaccc attcttaaat tgtttgtta 1500
 tgctgtgtga tggtttgtt ggtttttttt tgttgtgtt gttgtttttt tttctgtaa 1560
 aagatggcac ttaaaaccaa agcctgaaat ggtggtagaa atgctggggt ttttttgtt 1620
 30 tgtttgtttt ttcagttttc aagagtagat tgacttcagt cctacaaat gtacagtctt 1680
 gtattacatt gttaataaaa gtcaatgata aacttaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1740
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

1758

<210>5
 35 <211>89
 <212>PRT
 <213>Artificial Sequence

40 <223>Ligand peptide

<400>5
 Met Asn Ala Lys Val Val Val Val Leu Val Leu Val Leu Thr Ala
 5 10 15
 Leu Cys Leu Ser Asp Gly Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys
 45 20 25 30

THIS PAGE BLANK (USPTL

Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys
 35 40 45
 His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val
 50 55 60
 5 Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln Val Cys Ile Asp Pro Lys
 65 70 75
 Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys Ala Leu Asn Lys
 80 85

10 <210>6
 <211>2244
 <212>DNA
 <213>Mus

15 <220>
 <221>CDS
 <222>(471)...(743)

<400>6

20 gcacgggaca ggccgggcca caccacccgg ggcgagctcg gagggcggcg ctctgggagg 60
 agggcccggc ggctcggccc agggcgcggtt acctcgctcg cggggccgga gagggcgggc 120
 ggaggcacgg ggcctggagg cgccaggcgg aggatgcggg cgacacgggtg gcggcggcga 180
 ccgcgcgacc gggcgggagg ggcggcagg ggcgagcggg ggaggggagcg gactgcggca 240
 ggatctgtcg aggaaaaatc ttgcggccgg cgattccccg ccttttaagc gcagcctgca 300
 25 ctccccccac ccacgcagg ggcgggcctt ccccaacgcg ggcgcccaact ggccgccgcg 360
 cgccgctccc ctccagctcg cctgcgcctc tcactctccg tcagccgcat tgcccgctcg 420
 gcgtccggcc cccgaccgc gctcgtccgc cggcccgccc gcccgccgc gcc 473
 atg aac gcc aag gtc gtg gtc gtg ctg gtc ctc gtg ctg acc gcg 518
 ctc tgc ctc agc gac ggg aag ccc gtc agc ctg agc tac aga tgc 563
 30 cca tgc cga ttc ttc gaa agc cat gtt gcc aga gcc aac gtc aag 608
 cat ctc aaa att ctc aac act cca aac tgt gcc ctt cag att gta 653
 gcc cgg ctg aag aac aac aac aga caa gtg tgc att gac ccg aag 698
 cta aag tgg att cag gag tac ctg gag aaa gct tta aac aag taa 743
 gcacaacagc caaaaaggac tttccgctag acccactcga ggaaaactaa aaccttgtga 803
 35 gagatgaaag ggcaaagacg tgggggagg ggccttaacc atgaggacca ggtgtgtgtg 863
 tggggtgggc acattgatct gggatcgggc ctgaggtttg ccagcattta gaccctgcat 923
 ttatagcata cggatgata ttgcagctta tttcatcca tgccctgtac ctgtgcacgt 983
 tggaattttt attactgggg tttttctaag aaagaaattg tattatcaac agcattttca 1043
 agcagttagt tccttcatga tcatcacaat catcatcatt ctcattctca ttttttaaat 1103
 40 caacgagtac ttcaagatct gaatttggtg tgtttggagc atctcctctg ctcccctggg 1163
 gagtctgggc acagtcaggt ggtggcttaa caggagctg gaaaaagtgt cctttcttca 1223
 gacactgagg ctcccgagc agegccectc ccaagaggaa ggcctctgtg gactcagat 1283
 accgactggg gctgggcgcc gccactgcct tcacctcctc tttcaacctc agtgattggc 1343
 tctgtgggct ccatgtagaa gccactatta ctgggactgt gtcagagac ccctctccca 1403
 45 gctattccta ctctctcccc gactccgaga gcatgcatta atcttgcttc tgcttctcat 1463

THIS PAGE BLANK (USPTO)

5 ttctgtagcc tgatcagcgc cgcaccagcc gggaagaggg tgattgctgg ggctcgtgcc 1523
 ctgcatccct ctctcccag ggctgcccc acagctcggg ccctctgtga gatccgtctt 1583
 tggcctcctc cagaatggag ctggccctct cctggggatg tgtaatggtc cccctgctta 1643
 cccgcaaaag acaagtcttt acagaatcaa atgcaatttt aaatctgaga gctcgtttg 1703
 agtgactggg ttttgtgatt gcctctgaag cctatgtatg ccatggaggc actaacaac 1763
 tctgaggttt ccgaaatcag aagcgaaaaa atcagtgaat aaaccatcat cttgccacta 1823
 cccctcctg aagccacagc agggtttcag gtccaatca gaactgttg caaggtgaca 1883
 tttccatgca taaatgcgat ccacagaagg tcctgggtgt atttgtaact ttttgaagg 1943
 catTTTTTTa tatatatTTT tgtgcacatt tttttttacg tttctttaga aaacaaatgt 2003
 10 atttcaaaat atatttatag tcgaacaatt catatatTTg aagtggagcc atatgaatgt 2063
 cagtagttta tacttctcta ttatctcaa ctactggcaa tttgtaaaga aatatatatg 2123
 atatataaat gtgattgcag cttttcaatg ttagccacag tgtatttttt cacttgact 2183
 aaaattgtat caaatgtgac attatatgca ctagcaataa aatgctaatt gtttcatggt 2243
 a 2244

15

<210>7
 <211>89
 <212>PRT
 <213>Artificial Sequence

20

<223>Ligand peptide

<400>7
 Met Asp Ala Lys Val Val Ala Val Leu Ala Leu Val Leu Ala Ala
 25 5 10 15
 Leu Cys Ile Ser Asp Gly Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys
 20 25 30
 Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser His Ile Ala Arg Ala Asn Val Lys
 35 40 45
 30 His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val
 50 55 60
 Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln Val Cys Ile Asp Pro Lys
 65 70 75
 Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys Ala Leu Asn Lys
 35 80 85

<210>8
 <211>1781
 <212>DNA
 40 <213>Mua

<220>
 <221>CDS
 <222>(82)...(351)

45

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<400>8

gaccactttc cctctcggtc cacctcgggtg tcctcttgct gtccagctct gcagcctccg 60
 gcgcgcctc cgcgccacgc c 81

5 atg gac gcc aag gtc gtc gcc gtg ctg gcc ctg gtg ctg gcc gcg 126
 ctc tgc atc agt gac ggt aaa cca gtc agc ctg agc tac cga tgc 171
 ccc tgc cgg ttc ttc gag agc cac atc gcc aga gcc aac gtc aag 216
 cat ctg aaa atc ctc aac act cca aac tgt gcc ctt cag att gtt 261
 gca cgg ctg aag aac aac aac aga caa gtg tgc att gac ccg aaa 306
 tta aag tgg atc caa gag tac ctg gag aaa gct tta aac aag taa 351

10 gcacaacagc ccaaaggact ttccagtaga cccccgagga aggctgacat ccgtgggaga 411
 tgcaagggca gtggtgggga ggagggcctg aacctggcc aggatggccg gcgggacagc 471
 actgactggg gtcattgctaa ggtttgccag cataaagaca ctccgccata gcatatggta 531
 cgatattgca gcttatattc atccctgccc tcgcccgtgc acaatggagc ttttataact 591
 ggggtttttc taaggaattg tattacccta accagttage ttcattccca ttctcctcat 651

15 cctcatcttc attttaaaaa gcagtgatta cttcaagggc tgtattcagt ttgctttgga 711
 gcttctcttt gccctggggc ctctgggcac agttatagac ggtggctttg caggagagccc 771
 tagagagaaa ccttcacca gagcagagtc cgaggaacgc tgcagggctt gtctgcagg 831
 gggcgctcct cgacagatgc cttgtcctga gtcaacacaa gatccggcag agggaggctc 891
 ctttatccag ttcagtcca gggtcgggaa gcttccttta gaagtgatcc ctgaagctgt 951

20 gctcagagac cctttcctag ccgttctgc tctctgctg cctccaaacg catgcttcat 1011
 ctgacttccg cttctcacct ctgtagcctg acggaccaat gctgcaatgg aaggaggag 1071
 agtgatgtgg ggtgccccct cctctcttc cctttgctt cctctcactt gggccctttg 1131
 tgagattttt ctttgccctc ctgtagaatg gagccagacc atcctggata atgtgagaac 1191
 atgcctagat ttaccacaa aacacaagtc tgagaattaa tcataaacgg aagtttaa 1251

25 gaggatttgg accttggtta ttgtccctga gtctatata tttcaacagt ggctctatgg 1311
 gctctgatcg aatatcagt atgaaaataa taataataat aataataacg aataagccag 1371
 aatcttgcca tgaagccaca gtggggattc tgggttccaa tcagaaatgg agacaagata 1431
 aaacttgcac acattcttat gatcacagac ggccctgggtg gtttttggtg actatttaca 1491
 aggcattttt ttacatatat ttttgtgcac tttttatgtt tctttggaag acaaatgtat 1551

30 ttcagaatat atttgtagtc aattcatata tttgaagtgg agccatagta atgccagtag 1611
 atatctctat gatcttgagc tactggcaac ttgtaaagaa atatatatga catataaatg 1671
 tattgtagct ttccggtgtc agccacggtg tatttttcca cttggaatga aattgtatca 1731
 actgtgacat tatatgcact agcaataaaa tgctaattgt ttcattgctgt 1781

<210>9

<211>4

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>added peptide

<400>9

Arg Phe Lys Met

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210>10
<211>4
<212>PRT
<213>Artificial Sequence
5
<220>
<223>added peptide

<400>10
10 Arg Leu Lys Met

<210>11
<211>27
<212>DNA
15 <213>Artificial Sequence

<220>
<223>primer

20 <400>11
tagcggccgc gttgccatgg aaccgat 27

<210>12
<211>27
25 <212>DNA
<213>Artificial Sequence

<220>
<223>primer
30

<400>12
gcgtcgactt tgcataaggg ttagctg 27

THIS PAGE BLANK (USPTO)